

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE MATERIALES



Atrapamiento óptico de partículas de *upconversion*: fundamentos y aplicaciones

TESIS DOCTORAL

PALOMA RODRÍGUEZ SEVILLA

Directores de tesis:

Prof. DANIEL JAQUE GARCÍA

Dr. PATRICIA HARO GONZÁLEZ

Programa de doctorado:

Física de la Luz y la Materia.

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE MATERIALES



Optical trapping of upconverting particles: fundamentals and applications

DOCTORAL THESIS

PALOMA RODRÍGUEZ SEVILLA

Thesis supervisors:

Prof. DANIEL JAQUE GARCÍA

Dr. PATRICIA HARO GONZÁLEZ

PhD program:

Física de la Luz y la Materia.

Madrid, 2017

*A mis padres, Almu e Íñigo,
que me aguantaron y apoyaron
durante todo este proceso.*

AGRADECIMIENTOS.

Mis padres son investigadores y profesores de universidad, así que la ciencia siempre ha estado presente en mi vida. Fue mi madre la que en cuarto de carrera me instó a que comenzara a meterme en este mundillo, ya que, cuanto antes se empiece, mejor. En 2012 asalté a mi profesor de fotónica y le pedí poder conocer sus laboratorios y ver qué se cocía en ellos. Él, como siempre ha hecho con todo el mundo, me abrió las puertas del *Fluorescence Imaging Group*. Así es como comencé a pasar algunas horas después de clase aprendiendo como mover objetos diminutos atrapándolos con un láser. Después, una cosa llevó a la otra, y acabé realizando el trabajo de fin de máster con ellos y, más tarde, esta tesis doctoral.

Durante todos estos años ha habido muchas personas que, en mayor o menor medida, han influido en mi corta carrera científica, más concretamente, en el desarrollo de esta tesis. Aquí me gustaría agradecerse, aunque sea brevemente.

En primer lugar quería agradecer a mis directores de tesis, Patricia Haro González y Daniel Jaque García, todo lo que he aprendido de ellos durante estos años, tanto en el ámbito científico como en el personal. Conseguisteis que, aunque tuviera en un principio muchas dudas, me quedara y disfrutara de esta gran experiencia.

Dani, tras el susto has vuelto a la carga y has sido capaz de hacer que rematara la tesis. Durante estos años, te has encargado de la parte escrita y análisis de resultados. He aprendido muchísimo en las reuniones que celebrábamos para discutir las medidas. Al principio nunca entendemos nada, pero siempre nos haces encontrar la solución a fuerza de darle vueltas. Gracias por darme las herramientas para escribir mis propios *papers* y por enseñarme a confiar en los resultados que obtengo.

Patri, me hiciste muy fácil la entrada en el grupo gracias a tu simpatía y me fascinaste con el *trapping*. Tú te encargaste de supervisar la parte experimental y por culpa de eso tuviste que echar horas y horas conmigo los “días de células”, en los que había que quedarse hasta acabar el experimento, independientemente de si nos cerraban la facultad o nos quedábamos sin cenar. Has conseguido que, a día de hoy, sea independiente en el laboratorio y pueda ayudar y encargarme yo sola de los estudiantes que empiezan.

También me gustaría dar las gracias a los estudiantes, doctores y profesores que forman o han formado parte del FIG y que me han ayudado de una u otra manera.

Al profesor José Gracia Solé. Gracias por todo lo que hiciste cuando Dani no estaba. Es un gran alivio saber que, cuando los que deben entender algo no lo entienden, siempre se puede acudir a ti para que nos ilustres.

A Héctor Rodríguez Rodríguez. Fue un año de máster muy divertido en el que nos tuvimos que pegar por el *setup* de *trapping*. Gracias por entender mis referencias a los *Simpson* y por tu humor tan negro.

A Lucía Labrador Páez, que fue la primera con la que ejercí un poco de “mamá” científica y ayudé en sus primeros pasos con el *trapping*. Gracias a tu curso rápido de canario podré desenvolverme perfectamente cuando vaya a las islas.

A la doctora Laura Martínez Maestro, con quien compartí unos días geniales en Escocia. Tenías razón, Dani debería mandar a los becarios de estancia de dos en dos.

A la doctora Blanca del Rosal Rabes, que desapareció un buen día cuando la subieron a la quinta planta, pero que siempre ha estado ahí, dispuesta a ayudar y resolver cualquier duda.

A los doctores Emma Martín Rodríguez y Dirk Ortgies, que acaban de ser padres de una niña monísima. Gracias por responder a todas nuestras dudas de química y de mucho más. Gracias a vosotros las comidas son siempre muy ilustrativas e interesantes.

A Hu Jie, con quien todos desarrollamos nuestras dotes comunicativas. Deberíamos tomar ejemplo de ti y echarnos una siesta en el despacho si lo necesitamos.

Al doctor Francisco Sanz, quien nos prepara las células para los experimentos y no nos deja en la estacada, aunque se rompa una lámpara de mercurio y desalojen el edificio de Biología.

Además, me gustaría acordarme de los visitantes que hemos tenido, aunque no sepa si algún día leerán lo que he escrito o lo entenderán.

Uéslen Rocha. Creímos que, con tu marcha, los laboratorios permanecerían más ordenados, pero no ha resultado ser del todo cierto. Comencé no entendiendo nada de lo que me decías y acabamos haciendo un montón de chistes el uno del otro.

Erving Ximendes. Eras muy callado y tímido, pero nos sorprendiste a todos con tus dotes para los idiomas y lo bueno que eras en el laboratorio.

Kasia Prorok. Fueron unos meses muy intensos en los que me forzarse a soltarme con el inglés y me enseñaste mucho de la cultura polaca.

Eduardo Montes. Gracias por los “pelones” y tu (demasiada) caballerosidad. Espero que algún día se te acabe esa mala suerte que tienes con los experimentos.

Tian, que vino desde Singapur para enseñarnos que un estudiante de carrera puede aprender en dos días a usar los equipos y sacar resultados sorprendentes en un mes.

También quería agradecer a la gente del IMDEA: Leo, Rebeca, María y Gorka, todo lo que disfruté y aprendí con ellos esos pocos meses.

Tampoco podría olvidarme de la gente que no está en el mundillo, pero que influyen igualmente. Lorena, Laura y Viñals. Últimamente no nos hemos visto todo lo que deberíamos, pero estáis ahí apoyando. Gracias, Lorena, por quedarte conmigo aunque el colegio ya se acabó y por ponerme a prueba con ese “¿pero, eso del *trapping*, para qué sirve?”. Gracias, Laura, por preguntarme qué tal, darme ánimos y dejarme despotricar todo y más. Gracias, Viñals, por demostrar que uno puede conseguir lo que se propone. Espero que seas un gran radiofísico. También quería acordarme de dos chicas que están muy lejos, pero que cuando vuelven es como si no se hubieran ido. De Berta, que se nos fue a Valencia por amor y poco a poco está consiguiendo todo lo que quiere. Y de Elena, una de las mejores cosas que me han pasado en la vida. Ojala que encuentres tu ciudad en el mundo y que no esté muy lejos para que pueda ir a verte más a menudo. Si hubieras estado cerca, estos años habrían sido muy diferentes.

Y por último, quería agradecerles a mis padres y mi hermana todo lo que han hecho por mí. A lo mejor no habéis visto de primera mano el proceso completo, pero habéis estado ahí igualmente. Almu, gracias por aguantar mis chorradas y dejar que ejerciera de hermana mayor fastidiándote. Aunque creas que no, he aprendido mucho de ti y no solo de música. Papá, Mamá, me habéis apoyado, enseñado y avisado de las múltiples trampas burocráticas que tiene entregar la tesis. Menos mal que os pedí que me revisarais la tesis para no poner muchas burradas en la parte de química. Y, lo más importante, habéis conseguido que no vaya flotando tres metros por encima del suelo, como suelen hacer los físicos.

Y gracias a Íñigo, que ha aguantado de primera mano el proceso final. Has sido capaz de levantarme cuando me he hundido y de hacer que me dejara de tonterías y volviera a la realidad. Decidiste leerte la tesis entera sin que te lo pidiera y, gracias a ello, has evitado que quien la lea quede horrorizado por el abuso de ciertas locuciones pronominales, las cuales no merecen ser mencionadas.

En resumen, gracias a todos vosotros y a alguno más, como Paco Jaque, que también ha influido a su manera en esta tesis doctoral.

Por la parte económica, debo dar las gracias al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y al Fondo Social Europeo (FSE) por el programa estatal de “Promoción del talento y su Empleabilidad en I+D+i” (BES-2014-069410), cuya financiación ha hecho posible la realización de esta tesis. También, pude realizar una estancia en Reino Unido gracias a la financiación de *The Royal Society* (IE130466). Por último, el Banco Santander me permitió realizar una estancia en Singapur a través de “Proyectos de Cooperación Interuniversitaria” (2015/ASIA/06).

Finalmente, quería agradecer al departamento de Física de Materiales de la UAM las facilidades y recursos prestados, en especial al profesor Ginés Lifante, que nos ha permitido emplear sus laboratorios.

CONTENIDOS.

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN. | 15 |
| ABSTRACT. | 17 |
| CAPÍTULO 1: Introducción y motivación. | 19 |
| 1.1- Atrapamiento óptico. | 21 |
| 1.2- Partículas de <i>upconversion</i> . | 24 |
| 1.3- Qué se ha hecho y por qué. | 26 |
| 1.4- Referencias. | 26 |
| CAPÍTULO 2: Atrapamiento óptico. | 31 |
| 2.1- Fundamentos teóricos: regímenes de interacción. | 35 |
| 2.1a- Micropartículas. | 35 |
| 2.1b- Nanopartículas. | 38 |
| 2.1c- Partículas comparables a la longitud de onda. | 40 |
| 2.2- Calibración de la trampa óptica. | 41 |
| 2.2a- Métodos activos. | 41 |
| 2.2b- Métodos Pasivos. | 44 |
| 2.2c- Métodos directos. | 47 |
| 2.2d- Comparación de los métodos. | 48 |
| 2.3- Referencias. | 49 |
| CAPÍTULO 3: Procesos de <i>upconversion</i>. | 51 |
| 3.1- Mecanismos de <i>upconversion</i> en sistemas $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$. | 53 |
| 3.1a- Diagrama de niveles y espectro de emisión. | 56 |
| 3.1b- Probabilidades de absorción y emisión. | 59 |
| 3.1c- Procesos de transferencia de energía. | 61 |
| 3.1d- Proceso de <i>upconversion</i> en sistemas $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ con excitación a 980 nm. | 64 |
| 3.2- Influencia del tamaño: nano y micropartículas. | 70 |
| 3.3- Influencia de la fase cristalina de la matriz. | 71 |
| 3.4- Influencia de la geometría: emisión polarizada. | 71 |
| 3.5- Influencia de la temperatura en la emisión. | 72 |
| 3.5a- Termometría basada en el cambio de la forma espectral de la emisión. | 73 |
| 3.6- Referencias. | 75 |
| CAPÍTULO 4: Métodos experimentales. | 79 |
| 4.1- Síntesis de partículas. | 81 |
| 4.1a- Microemulsiones. | 81 |
| 4.1b- Procesos solvotermales. | 84 |
| 4.1c- Descomposiciones termal. | 88 |
| 4.1d- Modificación de la superficie de las partículas. | 90 |
| 4.2- Atrapamiento óptico: montaje experimental y consideraciones importantes. | 93 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2a- Montaje experimental..... | 94 |
| 4.2b- Determinación de la posición de la partícula..... | 99 |
| 4.2c- Coeficiente de rozamiento..... | 100 |
| 4.2d- Condiciones óptimas de atrapamiento. | 101 |
| 4.3- Caracterización básica..... | 103 |
| 4.3a- Microscopía electrónica. | 103 |
| 4.3b- Radio hidrodinámico y potencial zeta..... | 104 |
| 4.3c- Espectroscopía de extinción..... | 104 |
| 4.3d- Espectroscopía de emisión..... | 104 |
| 4.3e- Espectroscopía multifotónica..... | 105 |
| 4.3f- Atrapamiento óptico. | 105 |
| 4.4- Medidas celulares..... | 106 |
| 4.4a- Cultivos celulares para microreometría..... | 106 |
| 4.4b- Cultivos celulares para tratamiento fototérmico. | 106 |
| 4.5- Referencias..... | 107 |
| CAPÍTULO 5: Resultados..... | 109 |
| 5.1- Caracterización de partículas individuales..... | 111 |
| 5.1a- Proceso de <i>upconversion</i> en una micropartícula de NaYF ₄ :Er ³⁺ ,Yb ³⁺ | 111 |
| 5.1b- Espectro de emisión de una nanopartícula ópticamente aislada. | 116 |
| 5.1c- Emisión polarizada..... | 120 |
| 5.2- Determinación de la orientación de partículas atrapadas..... | 127 |
| 5.2a- Partículas cilíndricas..... | 129 |
| 5.2b- Partículas en forma de disco. | 132 |
| 5.3- Influencia de las características de la nanopartícula en la fuerza óptica..... | 137 |
| 5.4- Medidas térmicas a nivel celular. | 141 |
| 5.5- Medida de la viscosidad intracelular: Microreometría. | 147 |
| 5.6- Referencias..... | 155 |
| CAPÍTULO 6: Conclusiones..... | 159 |
| 6.1- Estudios de partículas individuales. | 161 |
| 6.1a- Proceso de <i>upconversion</i> en una micropartícula de NaYF ₄ :Er ³⁺ ,Yb ³⁺ | 161 |
| 6.1b- Espectro de una nanopartícula ópticamente aislada. | 161 |
| 6.1c- Emisión polarizada..... | 161 |
| 6.1d- Conclusiones generales de los estudios de partículas individuales. | 161 |
| 6.2- Orientación de partículas ópticamente atrapadas. | 162 |
| 6.3- Influencia de las características de la nanopartícula en la fuerza óptica..... | 162 |
| 6.4- Medidas de temperatura a nivel celular..... | 163 |
| 6.5- Medida de la viscosidad intracelular..... | 163 |
| 6.6- Perspectivas futuras. | 163 |
| CAPÍTULO 7: Conclusions..... | 167 |
| 7.1- Single particle studies. | 169 |
| 7.1a- Upconversion process in a NaYF ₄ :Er ³⁺ ,Yb ³⁺ microparticle. | 169 |
| 7.1b- Spectroscopy of an optically isolated nanoparticle. | 169 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7.1c- Polarized emission. | 169 |
| 7.1d- General conclusions for single particle studies..... | 169 |
| 7.2- Orientation of particles inside the optical trap..... | 170 |
| 7.3- Influence of the particle characteristics on the optical forces..... | 170 |
| 7.4- Thermometry at cellular level..... | 171 |
| 7.5- Intracellular viscosity measurements..... | 171 |
| 7.6- Future perspectives. | 171 |
| ANEXOS. | 173 |
| Anexo A. Cálculo de incertidumbres en medidas térmicas. | 175 |
| Anexo A.1. Resolución en la temperatura. | 175 |
| Anexo A.2. Resolución en la sensibilidad: | 175 |
| Anexo B. Transferencia de energía entre nanopartículas. | 177 |
| Anexo B.1. Cálculo del solape espectral. | 177 |
| Anexo B.2. Probabilidad de transferencia radiativa entre dos nanopartículas. | 177 |
| Anexo B.3. Cálculo de la distancia crítica. | 178 |
| Anexo C. Emisión verde de una partícula cilíndrica..... | 179 |
| Anexo D. Interiorización de partículas cilíndricas de oro por células HeLa. | 180 |
| Anexo E. Microreometría. | 181 |
| Anexo E.1. Método activo. | 181 |
| Anexo E.2. Método pasivo..... | 183 |
| Anexo F. Incorporación de las partículas en forma de disco por las células. | 185 |
| Anexo G. Viscosidades intracelulares publicadas en la literatura. | 186 |
| Referencias. | 188 |
| TABLA DE SÍMBOLOS Y CONSTANTES. | 189 |

RESUMEN.

El tema fundamental de esta tesis doctoral es el estudio del atrapamiento óptico de partículas de *upconversion* y su aplicación en ensayos biológicos. El atrapamiento óptico permite la manipulación de objetos, tanto nano como micrométricos, gracias a la presión de radiación que ejerce un haz láser focalizado. De esta manera, se puede controlar la posición del objeto atrapado en las tres dimensiones del espacio, empleando fuerzas ópticas cuya magnitud se encuentra entre unos pocos femtonewtons y cientos de piconewtons. El hecho de que las fuerzas ópticas se encuentren en el intervalo de aquéllas que rigen los procesos biológicos ha propiciado que esta herramienta tenga multitud de aplicaciones en el campo de la biología.

Los materiales de *upconversion* tienen la capacidad de emitir luz en la región visible o ultravioleta tras la absorción de radiación de menor energía (en el infrarrojo) que la emitida. Fue a principios del siglo XXI cuando su utilización se disparó gracias a la aparición de las micro y nanopartículas de *upconversion*. Entre todas las características que presentan se puede destacar el hecho de que la luminiscencia de ciertas partículas de *upconversion* dependa de las propiedades del entorno como, por ejemplo, la temperatura. Actualmente, las partículas de *upconversion* se emplean en multitud de aplicaciones, desde la fabricación de placas solares al desarrollo de tintas de seguridad, pasando por ensayos biomédicos.

En esta tesis doctoral se ha querido unir el potencial de la manipulación óptica con las extraordinarias características luminiscentes de las partículas de *upconversion*. En primer lugar, se desarrolló un sistema de pinzas ópticas modificado para la medida de la luminiscencia de la partícula ópticamente atrapada. Con este equipo experimental se caracterizó tanto las propiedades luminiscentes como el atrapamiento óptico de partículas de *upconversion*. Se determinó la dependencia de las fuerzas ópticas con las propiedades de la partícula con el fin de determinar las condiciones óptimas de atrapamiento. Además, se realizaron estudios fundamentales sobre la luminiscencia de partículas de *upconversion*. Gracias al atrapamiento óptico se pudo medir la luminiscencia de una única nanopartícula de *upconversion* ópticamente aislada. También se determinó la dependencia de la luminiscencia de partículas de *upconversion* no esféricas con el ángulo de polarización. Estos estudios preliminares permitieron determinar la orientación estable de las partículas en el interior de la trampa óptica.

Finalmente, se empleó todo lo aprendido del atrapamiento óptico de partículas de *upconversion* para la realización de experimentos *in vitro*. Se midió la extensión y magnitud del gradiente térmico generado en las proximidades de una célula sometida a un tratamiento fototérmico, empleando una partícula de *upconversion* ópticamente atrapada. También se desarrolló una técnica microrreométrica para la medida de la viscosidad intracelular basada en los torques ópticos inducidos sobre la partícula atrapada.

ABSTRACT.

The aim of this doctoral thesis is the analysis of the optical trapping of upconverting particles and its application in biological studies. Optical trapping allows the manipulation of nano and micrometric objects by means of the radiation pressure exerted by a focused laser beam. Thus, the optically trapped object can be three-dimensionally controlled by using optical forces in the range of several femtonewtons to hundreds of piconewtons. Optical trapping has multitude of applications in the biological field, since optical forces lie in the range of those ruling the biological processes.

Upconverting materials have the ability to emit light in the ultraviolet and visible ranges of the electromagnetic spectrum after the absorption of radiation of lower energy (infrared) than that emitted. Such materials boosted their use at the beginning of the 21st century, when the first upconverting micro and nanoparticles appeared. Among all the characteristics they present, it is worth mentioning that the luminescence of certain upconverting particles depends on the properties of the surrounding medium, such as the temperature. Nowadays, upconverting particles are used in lots of different applications, from the construction of solar cells to the development of security inks, including biomedical studies.

This doctoral thesis joins together the potential of optical manipulation and the outstanding characteristics of the upconverting particles. In the first place, an optical tweezers setup, which allows the detection and analysis of the luminescence of the optical trapped particle, has been developed. By using this experimental setup, the luminescent features of the upconverting particles, as well as their optical manipulation, have been studied. The dependence of the optical trapping forces on the particle characteristics has been determined in order to find the best optical trapping conditions. In addition, fundamental studies on the upconverting particle luminescence have been carried out. The luminescence of an optically isolated upconverting particle has been measured. Moreover, the dependence of the upconversion luminescence of non-spherical particles with the polarization state has been studied. These preliminary studies allowed to determine the stable orientation of the particles inside the optical trap.

Finally, all the acquired knowledge about the optical trapping of upconverting particles has been used in the development of *in vitro* experiments. The extension and magnitude of thermal gradients created in the surroundings of a photothermally treated cell have been measured by means of an optically trapped upconverting particle. In addition, a microrheometry technique has been developed for the characterization of the intracellular viscosity. This method is based on the optical torques exerted over the trapped particle.

CAPÍTULO 1: Introducción y motivación.

1.1- Atrapamiento óptico.

A lo largo de la historia se han ido desarrollando herramientas para poder observar y manipular objetos. En un primer momento, el ser humano solo era capaz de usar y estudiar los objetos de volumen y peso menor o semejante al suyo. Sin embargo era necesario el acceso a objetos mayores. Fue en la antigua Grecia cuando se inventó la grúa, lo que abrió un mundo de posibilidades, especialmente en la construcción. Por otro lado, el mundo microscópico se hizo accesible en el siglo XVII gracias a la invención del microscopio.[1] Los primeros en emplear esta nueva herramienta para la caracterización de microorganismos y el interior del ser humano fueron Marcello Malpighi y Anton van Leeuwenhoek.[1] Casi dos siglos después, en 1939, se comercializó el primer microscopio electrónico que permitió llegar a escalas que óptica no permite alcanzar. Actualmente es posible la adquisición de vídeos de la dinámica de nanopartículas en dispersión. Dongsheng Li y colaboradores grabaron cómo dos partículas se fundían en una sola cuando sus planos cristalinos se alineaban.[2]

Sin embargo, los estudios a nivel micro y nanométrico eran incompletos ya que únicamente se podía “ver, pero no tocar”. No fue hasta finales del siglo XX cuando empezó a forjarse una nueva herramienta que, como la grúa, permitía acceder a la manipulación de objetos en una nueva escala de tamaños. En 1970 Arthur Ashkin publicó un artículo en el que demostraba que la luz es capaz de ejercer fuerza sobre objetos de tamaño micrométrico.[3] Gracias a la presión de radiación ejercida por un haz láser focalizado, Ashkin fue capaz de acelerar y atrapar microesferas dieléctricas. Ashkin descubrió la existencia de dos componentes de la fuerza de radiación: la fuerza de gradiente, la cual atrae a la partícula hacia la región de mayor intensidad, y la fuerza de *scattering*, que empuja a la partícula en la dirección de propagación del haz. También observó que, al colocar dos haces enfrentados, las partículas quedaban atrapadas en las tres dimensiones del espacio cuando las fuerzas de empuje se igualaban (ver **Figura 1.1**). Así se construyó la primera trampa óptica. Gracias a estos descubrimientos y a su posterior investigación, Arthur Ashkin está considerado como el padre del atrapamiento óptico.

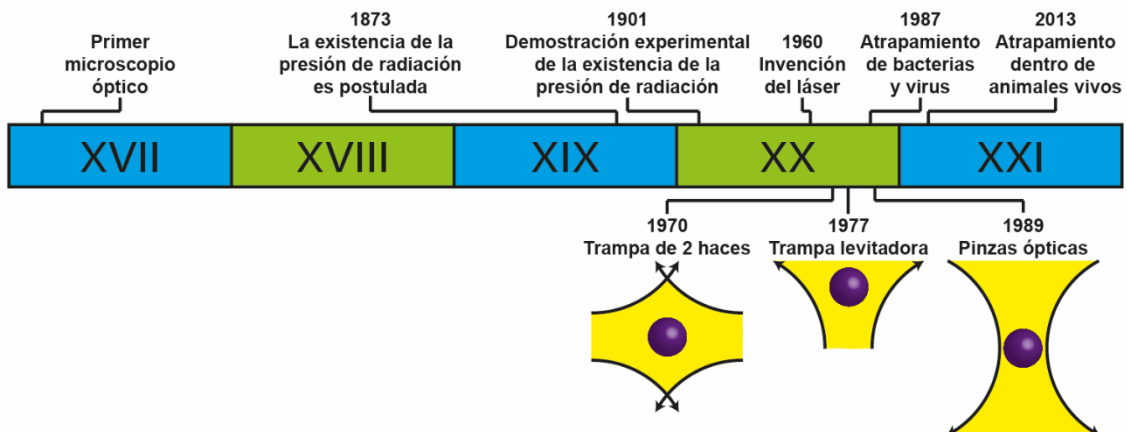


Figura 1.1 Eje cronológico. Se detallan los eventos más importantes relacionados con el atrapamiento óptico.

Es importante mencionar que sin la invención del láser, hacia 1960, esta técnica no existiría. La fuerza de radiación era conocida con anterioridad a las investigaciones de Ashkin (fue teóricamente postulada por James Clerk Marcell en 1873), pero su magnitud es tan pequeña que queda oculta por otros fenómenos. Por esta razón pocos pudieron realmente demostrar su existencia.[4] Fue con la llegada del láser cuando se pudieron alcanzar fuerzas de radiación mayores que las producidas por la energía térmica y el efecto radiométrico (fuerza de repulsión entre dos superficies a distinta temperatura). Ashkin calculó la fuerza ejercida por un haz de luz de potencia P y frecuencia ν sobre un espejo completamente reflectante.[5] El número de fotones incidentes por unidad de tiempo es $P/h\nu$ y cada uno de ellos tienen un momento $h\nu/c$ (donde h y c son la constante de Planck y la velocidad de la luz, respectivamente). Si se considera que los fotones son completamente reflejados por el espejo, el momento total transferido a éste es $2(P/h\nu)(h\nu/c) = 2P/c$. La fuerza de radiación (F_{rad}) producida es proporcional a la transferencia de momento: $F_{rad} = Q2P/c$, donde Q representa la fracción del momento transferido.[3] En el caso de un material completamente reflectante, $Q = 1$, por lo que la fuerza de radiación para una potencia de 1 W es $F_{rad} = 3 \text{ nN}$. Esta fuerza puede parecer pequeña, pero Ashkin se dio cuenta que la aceleración (a) que ésta produce sobre objetos del tamaño de micras ($M = 10^{-15} \text{ Kg}$ en el caso de una esfera de sílice de $1 \mu\text{m}$ de diámetro) no es despreciable ya que su magnitud es mucho mayor que la de la gravedad (g): $a = F_{rad}/M = 3 \times 10^6 \text{ m/s}^2 \approx 10^5 g$. Únicamente se pueden alcanzar fuerzas de radiación de esa magnitud si se emplean potencias de decenas de milivatios o mayores. Esto hace que, como se ha mencionado anteriormente, la invención del láser fuera indispensable para el desarrollo del atrapamiento óptico.

Basada en el simple cálculo anterior surgió un nuevo tipo de trampa óptica que permitía levitar objetos pequeños (partículas, gotas de aceite, etc.) en el aire o vacío gracias a la acción de la gravedad, la cual contrarrestaba la fuerza de radiación de empuje (ver **Figura 1.1**).[6] El objeto no escapaba por los laterales de la trampa gracias a la fuerza de gradiente. Una de las ventajas del sistema desarrollado era que permitía medir fuerzas externas (por ejemplo eléctrica o de arrastre) ejercidas sobre la partícula atrapada.[7] La trampa óptica era capaz de ajustar la potencia aplicada para mantener al objeto atrapado a una altura determinada. El cambio en la potencia daba una medida directa de la fuerza externa aplicada. Hoy en día, el uso de este tipo de trampas está muy extendido. En multitud de estudios se emplean objetivos invertidos para crear una trampa óptica estable.

Los estudios realizados sobre el atrapamiento óptico de átomos llevaron a Ashkin a proponer un nuevo tipo de trampa óptica, que constituye realmente las denominadas pinzas ópticas. Está compuesta de un único haz láser focalizado (ver **Figura 1.1**). En este caso, el empuje en la dirección axial (a lo largo del eje de propagación de la luz) debido a la fuerza de *scattering* es contrarrestado por la fuerza de gradiente en esa dirección. En 1986, Ashkin y colaboradores publicaron el primer trabajo sobre atrapamiento de partículas dieléctricas con tamaños que iban desde $10 \mu\text{m}$ a 25 nm . [8] Demostraron así que las pinzas ópticas (un único haz focalizado) permiten atrapar y manipular un gran intervalo de tamaños de partícula. Este tipo de trampas ópticas permiten trabajar con el objetivo de atrapamiento situado encima de la muestra: beneficioso para ciertas aplicaciones. En estos casos, la fuerza de gradiente en la dirección axial debe contrarrestar tanto la fuerza de *scattering* como la de la gravedad (si la flotabilidad no es suficiente).

La posibilidad de manipular y controlar objetos micro y nanométricos abrió un mundo de posibilidades en multitud de campos de estudio.[5] Entre todos ellos destaca la biología. Esta ciencia se ha visto increíblemente beneficiada del desarrollo de las pinzas ópticas.[9] Con ellas se han podido atrapar y controlar desde células enteras hasta orgánulos intracelulares.[10] En 1987 se publicó el primer artículo en el que se demostraba el atrapamiento óptico de virus y bacterias.[11] En él, Ashkin vio que el atrapamiento óptico empleando un haz de longitud de onda de 515 nm podía dañar e incluso matar a las células atrapadas. Esto le llevó a buscar las condiciones idóneas para minimizar ese riesgo. Decidió probar otras longitudes de onda con el fin de ver si eran menos dañinas para la célula. Descubrió que, empleando un haz de atrapamiento de 1060 nm, las células atrapadas se veían menos afectadas por la radiación que empleando 515 nm.[12] Ashkin concluyó que la longitud de onda en el infrarrojo es muy poco absorbida por el material celular y el agua circundante, en comparación con la radiación en la región visible. Esto permitió minimizar el daño celular. La ausencia de daño permitió a Ashkin presenciar la división de una célula atrapada ópticamente. Estos resultados demostraron las posibilidades que presenta el atrapamiento óptico para la realización de estudios biológicos.

Aparte de permitir el control espacial, las fuerzas ópticas ejercidas (del orden de piconewtons) permiten poner a prueba las propiedades reológicas de la célula: elasticidad, viscosidad y capacidad de deformación.[13-18] En 1989 Ashkin mostró el carácter viscolástico de la célula manipulando fibras en el citoplasma de células vegetales.[19] La capacidad de realizar este tipo de estudios es de gran importancia ya que se pueden analizar a nivel celular los efectos de fármacos o enfermedades.[15, 20] En combinación con la espectroscopía Raman, el atrapamiento óptico también se ha empleado para el diagnóstico.[21, 22] El aislamiento óptico de células individuales y la medida de su espectro Raman ha permitido diferenciar distintos tipos de células pudiendo detectar si son cancerosas o sanas.

Desde aquellos primeros experimentos, el atrapamiento óptico de células ha evolucionado y mejorado. Se han realizados diferentes estudios con el fin de buscar las mejores condiciones para minimizar la acción sobre la célula estudiada.[23] Actualmente incluso se ha demostrado la manipulación de células y partículas en el interior de animales vivos.[24-26]

El interior celular también es accesible gracias a las pinzas ópticas.[27] En 1987 Ashkin demostró que orgánulos intracelulares podían también ser ópticamente atrapados y manipulados a lo largo del citoplasma.[12] Desde entonces, se han podido estudiar la mecánica, la cinética y las fuerzas generadas por moléculas esenciales para la vida celular. En 1990, Michael W. Berns empleó el atrapamiento óptico para estudiar el movimiento de cromosomas. Desde entonces, multitud de grupos han dedicado sus esfuerzos al estudio de los ácidos nucleicos (ADN y ARN).[28-34] Otro campo importante de estudio lo constituyen los motores moleculares como, por ejemplo, la kinesina, miosina o dineína. Estas moléculas son capaces de moverse a lo largo de filamentos para transportar vesículas (kinesina) o simplemente ejercen fuerza para un cierto propósito (contracción muscular debida a la miosina). Tomando como ejemplo la kinesina, gracias a las pinzas ópticas se ha podido medir la velocidad de translocación, el tamaño de los pasos y la fuerza ejercida por este motor molecular.[30, 35, 36] El primer estudio de este tipo fue

realizado por Steven M. Block y colaboradores en 1990.[37] Una de las conclusiones más importantes de ese trabajo fue que el atrapamiento óptico permite estudiar moléculas aisladas en contraposición a los estudios que se realizaban anteriormente, de los que únicamente se obtenía una medida de la actividad promedio de un grupo de moléculas.

La mayoría de los trabajos de atrapamiento óptico dedicados a estudios biológicos emplean esferas de sílice o poliestireno a las que se adhieren las células o moléculas a estudio para su posterior manipulación. Sin embargo, las partículas atrapadas también pueden emplearse como sensores para caracterizar el ambiente biológico. Este es el caso de las partículas luminiscentes cuya emisión puede variar con las propiedades del entorno. El láser de atrapamiento puede actuar, además de para inmovilizar a la partícula, para excitar su luminiscencia. Así se pueden realizar medidas de, por ejemplo, temperatura a escala celular de manera remota. En este sentido, un tipo de partícula luminiscente destaca por encima de todas: las partículas de *upconversion*.

1.2- Partículas de *upconversion*.

Entre todas las partículas luminiscentes encontramos las denominadas de *upconversion*, capaces de emitir luz de menor longitud de onda (región visible o ultravioleta) que la radiación absorbida (infrarroja). Para ello es necesaria la absorción secuencial de dos o más fotones para poblar niveles energéticos de mayor energía desde los que se produce la emisión. Este tipo de partículas se han empleado en multitud de campos, desde la producción de placas solares a estudios biológicos pasando por el desarrollo de tintas de seguridad.[38-45] Esta introducción se centrará en el beneficio que ha supuesto el proceso de *upconversion* para la biología ya que uno de los objetivos de esta tesis es el desarrollo de técnicas que empleen el atrapamiento óptico de partículas de *upconversion* para estudios biológicos.

El fenómeno de *upconversion* fue postulado en 1959 por Nicolaas Bloembergen al intentar desarrollar un fotodetector de infrarrojo.[46, 47] Las primeras evidencias de este fenómeno llegaron dos años después tras la invención del láser, que permitió excitar los materiales con luz coherente de alta densidad de potencia, necesaria para que se produjera el proceso de *upconversion*. [48] Años después, la investigación en este campo dio un vuelco cuando los iones de lantánidos entraron en escena. Éstos constan de niveles energéticos intermedios reales cuya vida media es suficientemente larga como para facilitar la absorción de radiación en esos estados excitados sin la necesidad de altas densidades de potencia. El concepto de *upconversion* basado en iones lantánidos data de 1961, cuando John Porter observó luminiscencia producida por un cristal dopado con iones de praseodimio a los que excitaba con fotones no simultáneos.[49] Sin embargo el fenómeno de *upconversion* se ha ligado al nombre de François Auzel debido a los importantes descubrimientos que realizó en los procesos que involucran a dos iones. En estos procesos de *upconversion* el primer ion absorbía la radiación incidente y luego esa energía era posteriormente transferida a un segundo ion, el cual emitía la radiación de menor longitud de onda. Este es el caso de los sistemas Yb/Er estudiados en esta tesis.

Todos estos primeros experimentos se centraron en cristales macroscópicos. No fue hasta el comienzo del siglo XXI cuando el fenómeno de *upconversion* comenzó a mostrar su verdadero potencial con la aparición de los nanomateriales de *upconversion*. [49] El

reducido tamaño y la baja toxicidad que presentan les abrió la puerta en el campo de la biología y la medicina. Son comúnmente empleadas para la toma de imágenes celulares (ópticas, térmicas, de viscosidad, etc.) y para la detección y cuantificación de moléculas *in vitro*. [50-56] En este último tipo de estudios, las partículas son adheridas químicamente a la molécula de interés. De esta manera las moléculas quedan marcadas y se puede cuantificar la cantidad de ellas a través de la luminiscencia de las partículas de *upconversion*. En estos experimentos es imprescindible que el tamaño de la partícula sea comparable o menor que el de la molécula a identificar para obtener una buena resolución espacial. Por ello, es necesario el desarrollo de nanopartículas con una alta luminiscencia que permita la detección de una sola de ellas.

Además, las partículas de *upconversion* se han empleado en experimentos *in vivo*. Gracias a sus propiedades luminiscentes, pueden ser localizadas y monitorizadas en el interior de animales vivos. [57-61] Esto abre la puerta a la identificación de moléculas y células para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, en especial el cáncer. [45, 62-64] Tanto en los experimentos *in vitro* como en los *in vivo*, la superficie de las partículas de *upconversion* es modificada de tal manera que presente las características necesarias para su unión con las moléculas diana (las que se quiere identificar). Por ejemplo, las células cancerosas presentan un número mayor de receptores de folato que las células normales. Recubriendo las partículas de *upconversion* con las moléculas por las que tiene gran afinidad ese receptor, se puede conseguir que éstas se unan selectivamente a las células cancerosas y así poder localizarlas. [45] Esta misma estrategia se puede emplear para la liberación de fármacos y el tratamiento de afecciones de manera selectiva. Existen reacciones químicas que pueden activarse por acción de la luz. En este fenómeno se basan las terapias fotodinámicas. [65] En ellas, una molécula fotosensible es activada por la absorción de radiación de una determinada longitud de onda y ésta libera oxígeno singlete, que es muy tóxico para las células. Las longitudes de onda necesarias para la activación de la molécula suelen encontrarse en la región ultravioleta. La penetración en los tejidos de la radiación de esas longitudes de onda es muy limitada complicando el tratamiento *in vivo*. Sin embargo, las partículas de *upconversion* pueden generar luz a esas longitudes de onda al absorber luz infrarroja, que presenta una menor interacción con los tejidos biológicos si se encuentra en una de las cuatro denominadas ventanas biológicas. [66, 67]. De esta manera se pueden activar las moléculas a través de las partículas de *upconversion*. Como la liberación de oxígeno solo tiene lugar en la región donde se encuentra las partículas, se pueden realizar tratamientos localizados. De esta misma manera se pueden desencadenar procesos o liberar fármacos en lugares específicos. [68-71] En este tipo de técnicas, las partículas de *upconversion* permiten tanto activar el tratamiento como visualizar la región tratada.

Otra propiedad que presentan algunas partículas de *upconversion* es su capacidad de monitorizar cambios en la temperatura del medio que las rodea a través de su luminiscencia. [72, 73] Esto es de gran utilidad debido a que la temperatura es un parámetro determinante en biología ya que rige los procesos biológicos y puede ser indicativo de enfermedades. Además, existen tratamientos basados en el incremento de la temperatura celular por encima de los límites biológicos con el fin de eliminar, por ejemplo, tejidos cancerosos. Estas son las denominadas terapias fototérmicas. En este sentido, las partículas de *upconversion* pueden emplearse como termómetros con el fin de controlar la temperatura durante esos tratamientos y evitar daños no deseados en

tejidos circundantes. Además, mediante el diseño específico, se pueden obtener partículas que actúen como agentes calentadores al mismo tiempo que permiten una medida de la temperatura.[67]

1.3- Qué se ha hecho y por qué.

El objetivo final de esta tesis doctoral es el desarrollo de técnicas basadas en el atrapamiento óptico de partículas de *upconversion* que puedan emplearse para estudios biológicos. Como se ha visto en los dos puntos anteriores, el atrapamiento óptico y las partículas de *upconversion* se han estado empleando por separado para la realización de estudios biológicos desde hace varias décadas. Sin embargo, pocos autores se han detenido en combinar ambas herramientas. Pueden encontrarse trabajos en los que se estudia el atrapamiento óptico de partículas de *upconversion*, algunos incluso emplean la manipulación de partículas luminiscentes (aunque no de *upconversion*) para realizar medidas térmicas, pero ninguno de ellos llega a demostrar su aplicación en el campo de la biología o la medicina.[74-77]

Con el objetivo final planteado, se comenzó con el desarrollo de un sistema de pinzas ópticas que permitiera la caracterización de la luminiscencia de las partículas de *upconversion* atrapadas. Con él se analizó la manipulación de este tipo de partículas y las propiedades luminiscentes de éstas. Finalmente, se llevaron a cabo dos estudios *in vitro*. En el primero de ellos se midió la extensión y la magnitud del gradiente térmico generado en las cercanías de una célula que estaba siendo sometida a un proceso fototérmico. Para caracterizar la temperatura del medio empleó la luminiscencia de una partícula de *upconversion* ópticamente atrapada. Finalmente, se empleó la luminiscencia polarizada de partículas de *upconversion* para realizar una medida de la viscosidad intracelular. Este estudio permitió evidenciar el carácter viscoso del citoplasma de células HeLa.

1.4- Referencias.

1. W. Dock, *THE LURE OF MEDICAL HISTORY: MALPIGHI AND LEEUWENHOEK: The Early Microscopists*. California and western medicine, 1928. **29**(5): p. 333.
2. D. Li, et al., *Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment*. Science, 2012. **336**(6084): p. 1014.
3. A. Ashkin, *Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure*. Physical Review Letters, 1970. **24**(4): p. 156.
4. E. F. Nichols and G. F. Hull, *A preliminary communication on the pressure of heat and light radiation*. Physical Review, 1901. **13**(5): p. 307.
5. A. Ashkin, *History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2000. **6**(6): p. 841.
6. A. Ashkin and J. M. Dziedzic, *Feedback stabilization of optically levitated particles*. Applied Physics Letters, 1977. **30**(4): p. 202.
7. A. Ashkin, *Applications of Laser Radiation Pressure*. Science, 1980. **210**(4474): p. 1081.
8. A. Ashkin, et al., *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. Optics Letters, 1986. **11**(5): p. 288.
9. K. Svoboda and S. M. Block, *Biological applications of optical forces*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994. **23**: p. 247.
10. H. Zhang and K.-K. Liu, *Optical tweezers for single cells*. Journal of the Royal Society Interface, 2008. **5**(24): p. 671.
11. A. Ashkin and J. Dziedzic, *Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*. Science, 1987. **235**(4795): p. 1517.

12. A. Ashkin, et al., *Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*. Nature, 1987. **330**(6150): p. 769.
13. J. Mills, et al., *Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers*. MCB-TECH SCIENCE PRESS-, 2004. **1**: p. 169.
14. J. Sleep, et al., *Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study*. Biophysical Journal, 1999. **77**(6): p. 3085.
15. C. Ying-chun and W. Chien-ming, *To Study the Effect of Paclitaxel on the Cytoplasmic Viscosity of Murine Macrophage Immune Cell RAW 264.7 Using Self-Developed Optical Tweezers System*. Japanese Journal of Applied Physics, 2012. **51**(12R): p. 127001.
16. A. Yao, et al., *Microrheology with optical tweezers*. Lab on a Chip, 2009. **9**(17): p. 2568.
17. J. Mas, et al., *Quantitative determination of optical trapping strength and viscoelastic moduli inside living cells*. Physical Biology, 2013. **10**(4).
18. S. Nawaz, et al., *Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations*. Plos One, 2012. **7**(9).
19. A. Ashkin and J. M. Dziedzic, *Internal cell manipulation using infrared laser traps*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(20): p. 7914.
20. M. C. DeSantis, et al., *Quantitative Correlation between Infectivity and Gp120 Density on HIV-1 Virions Revealed by Optical Trapping Virometry*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(25): p. 13088.
21. C. N. LaFratta, *Optical tweezers for medical diagnostics*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(17): p. 5671.
22. J. W. Chan, et al., *Nondestructive Identification of Individual Leukemia Cells by Laser Trapping Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(6): p. 2180.
23. H. Liang, et al., *Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping*. Biophysical Journal, 1996. **70**(3): p. 1529.
24. M.-C. Zhong, et al., *Optical trapping of red blood cells in living animals with a water immersion objective*. Optics Letters, 2013. **38**(23): p. 5134.
25. P. L. Johansen, et al., *Optical micromanipulation of nanoparticles and cells inside living zebrafish*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10974.
26. M.-C. Zhong, et al., *Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers*. Nature Communications, 2013. **4**: p. 1768.
27. K. Norregaard, et al., *Optical manipulation of single molecules in the living cell*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(25): p. 12614.
28. T. Perkins, et al., *Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain*. Science, 1994. **264**(5160): p. 819.
29. U. Bockelmann, et al., *Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips*. Biophysical Journal, 2002. **82**(3): p. 1537.
30. R. T. Dame, et al., *Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 387.
31. L. Oroszi, et al., *Direct Measurement of Torque in an Optical Trap and Its Application to Double-Strand DNA*. Physical Review Letters, 2006. **97**(5): p. 058301.
32. S. B. Smith, et al., *Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules*. Science, 1996. **271**(5250): p. 795.
33. I. A. Vorobjev, et al., *Optical trapping for chromosome manipulation - a wavelength dependence of induced chromosome bridges*. Biophysical Journal, 1993. **64**(2): p. 533.
34. Y. R. Chemla, *High-resolution, hybrid optical trapping methods, and their application to nucleic acid processing proteins*. Biopolymers, 2016. **105**(10): p. 704.
35. K. Svoboda, et al., *Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry*. Nature, 1993. **365**(6448): p. 721.
36. B. H. Blehm, et al., *In vivo optical trapping indicates kinesin's stall force is reduced by dynein during intracellular transport*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(9): p. 3381.
37. S. M. Block, et al., *Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 348.

38. Y. Zhang, et al., *Multicolor Barcoding in a Single Upconversion Crystal*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(13): p. 4893.
39. F. Wang, et al., *Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy*. Analyst, 2010. **135**(8): p. 1839.
40. J. Chen and J. X. Zhao, *Upconversion Nanomaterials: Synthesis, Mechanism, and Applications in Sensing*. Sensors, 2012. **12**(3): p. 2414.
41. S. Hao, et al., *Sensing Using Rare-Earth-Doped Upconversion Nanoparticles*. Theranostics, 2013. **3**(5): p. 331.
42. N. Phuong-Diem, et al., *Upconversion Nanoparticles in Bioassays, Optical Imaging and Therapy*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014. **14**(1): p. 157.
43. S. Zeng, et al., *Upconversion: Simultaneous Realization of Phase/Size Manipulation, Upconversion Luminescence Enhancement, and Blood Vessel Imaging in Multifunctional Nanoprobes Through Transition Metal Mn²⁺ Doping*. Advanced Functional Materials, 2014. **24**(26): p. 4196.
44. J. C. Goldschmidt and S. Fischer, *Upconversion for Photovoltaics - a Review of Materials, Devices and Concepts for Performance Enhancement*. Advanced Optical Materials, 2015. **3**(4): p. 510.
45. W. Fang and Y. Wei, *Upconversion nanoparticle as a theranostic agent for tumor imaging and therapy*. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2016. **09**(04): p. 1630006.
46. N. Bloembergen, *Solid State Infrared Quantum Counters*. Physical Review Letters, 1959. **2**(3): p. 84.
47. B. Zhou, et al., *Controlling upconversion nanocrystals for emerging applications*. Nat Nano, 2015. **10**(11): p. 924.
48. P. A. Franken, et al., *Generation of Optical Harmonics*. Physical Review Letters, 1961. **7**(4): p. 118.
49. M. Bettinelli, et al., *Lanthanide-doped upconversion nanoparticles*. Physics Today, 2015. **68**(9): p. 38.
50. R. Deng, et al., *Intracellular Glutathione Detection Using MnO₂-Nanosheet-Modified Upconversion Nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(50): p. 20168.
51. L. M. Higgins, et al., *Line-scanning confocal microscopy for high-resolution imaging of upconverting rare-earth-based contrast agents*. Journal of Biomedical Optics, 2015. **20**(11): p. 110506.
52. S. Chen, et al., *Mapping Live Cell Viscosity with an Aggregation-Induced Emission Fluorogen by Means of Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging*. Chemistry – A European Journal, 2015. **21**(11): p. 4315.
53. D. J. Gargas, et al., *Engineering bright sub-10-nm upconverting nanocrystals for single-molecule imaging*. Nature Nanotechnology, 2014. **9**(4): p. 300.
54. S. H. Nam, et al., *Long-Term Real-Time Tracking of Lanthanide Ion Doped Upconverting Nanoparticles in Living Cells*. Angewandte Chemie, 2011. **123**(27): p. 6217.
55. F. Vetrone, et al., *Intracellular imaging of HeLa cells by non-functionalized NaYF₄ : Er³⁺, Yb³⁺ upconverting nanoparticles*. Nanoscale, 2010. **2**(4): p. 495.
56. F. Vetrone, et al., *Temperature Sensing Using Fluorescent Nanothermometers*. ACS Nano, 2010. **4**(6): p. 3254.
57. S. F. Lim, et al., *In Vivo and Scanning Electron Microscopy Imaging of Upconverting Nanophosphors in Caenorhabditis elegans*. Nano Letters, 2006. **6**(2): p. 169.
58. A. Hirschmüller, et al., *In-Vivo Imaging of the Uptake of Upconversion Nanoparticles by Plant Roots*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2009. **5**(3): p. 278.
59. L. Xiong, et al., *Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors*. Biomaterials, 2010. **31**(27): p. 7078.
60. M. Hu, et al., *Synergistically enhanced upconversion luminescence in Li⁺-doped core-shell-structured ultrasmall nanoprobes for dual-mode deep tissue fluorescence/CT imaging*. Journal of Materials Chemistry B, 2017. **5**(14): p. 2662.
61. S. A. Hilderbrand and R. Weissleder, *Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging*. Current Opinion in Chemical Biology, 2010. **14**(1): p. 71.

62. X. Ai, et al., *In vivo covalent cross-linking of photon-converted rare-earth nanostructures for tumour localization and theranostics*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 10432.
63. G. Chen, et al., *Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics*. Chemical Reviews, 2014. **114**(10): p. 5161.
64. Y. I. Park, et al., *Theranostic Probe Based on Lanthanide-Doped Nanoparticles for Simultaneous In Vivo Dual-Modal Imaging and Photodynamic Therapy*. Advanced materials, 2012. **24**(42): p. 5755.
65. D. E. J. G. J. Dolmans, et al., *Photodynamic therapy for cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 380.
66. I. E. Kolesnikov, et al., *Nd³⁺-doped YVO₄ nanoparticles for luminescence nanothermometry in the first and second biological windows*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2016. **235**: p. 287.
67. H. Suo, et al., *All-in-one thermometer-heater up-converting platform YF₃:Yb³⁺,Tm³⁺ operating in the first biological window*. Journal of Materials Chemistry C, 2017. **5**(6): p. 1501.
68. F. Ai, et al., *A core-shell-shell nanoplatfrom upconverting near-infrared light at 808 nm for luminescence imaging and photodynamic therapy of cancer*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 10785.
69. Y. Yang, et al., *NIR Photoresponsive Crosslinked Upconverting Nanocarriers Toward Selective Intracellular Drug Release*. Small, 2013. **9**(17): p. 2937.
70. C. Gao, et al., *Stem-Cell-Membrane Camouflaging on Near-Infrared Photoactivated Upconversion Nanoarchitectures for in Vivo Remote-Controlled Photodynamic Therapy*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016. **8**(50): p. 34252.
71. C. Wang, et al., *Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy*. Biomaterials, 2011. **32**(4): p. 1110.
72. D. Jaque and F. Vetrone, *Luminescence nanothermometry*. Nanoscale, 2012. **4**(15): p. 4301.
73. L. D. Menezes and C. B. de Arajo, *Optically Detected Thermal Effects in Rare-Earth Doped Materials for Host Characterization, Thermometric Devices, Nanothermometry and Biothermometry*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2015. **26**(12): p. 2405.
74. P. Haro-Gonzalez, et al., *Optical trapping of NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺ upconverting fluorescent nanoparticles*. Nanoscale, 2013. **5**(24): p. 12192.
75. F. M. Mor, et al., *Upconversion Particle as a Local Luminescent Brownian Probe: A Photonic Force Microscopy Study*. ACS Photonics, 2014. **1**(12): p. 1251.
76. Y. Nakayama, et al., *Tunable nanowire nonlinear optical probe*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1098.
77. S. Baral, et al., *Nanothermometry using optically trapped erbium oxide nanoparticle*. Applied Physics A, 2016. **122**(4): p. 1.

CAPÍTULO 2: Atrapamiento óptico.

El atrapamiento óptico se basa en las fuerzas que ejerce la luz sobre partículas de reducido tamaño. Empleando un haz focalizado se pueden atrapar y manipular partículas del orden de nanómetros o micras. La trampa óptica (**Figura 2.1a**) se ubica en la región del foco del láser donde se genera un gradiente espacial del campo electromagnético en el que el valor máximo de intensidad de luz se da en el centro de la trampa.

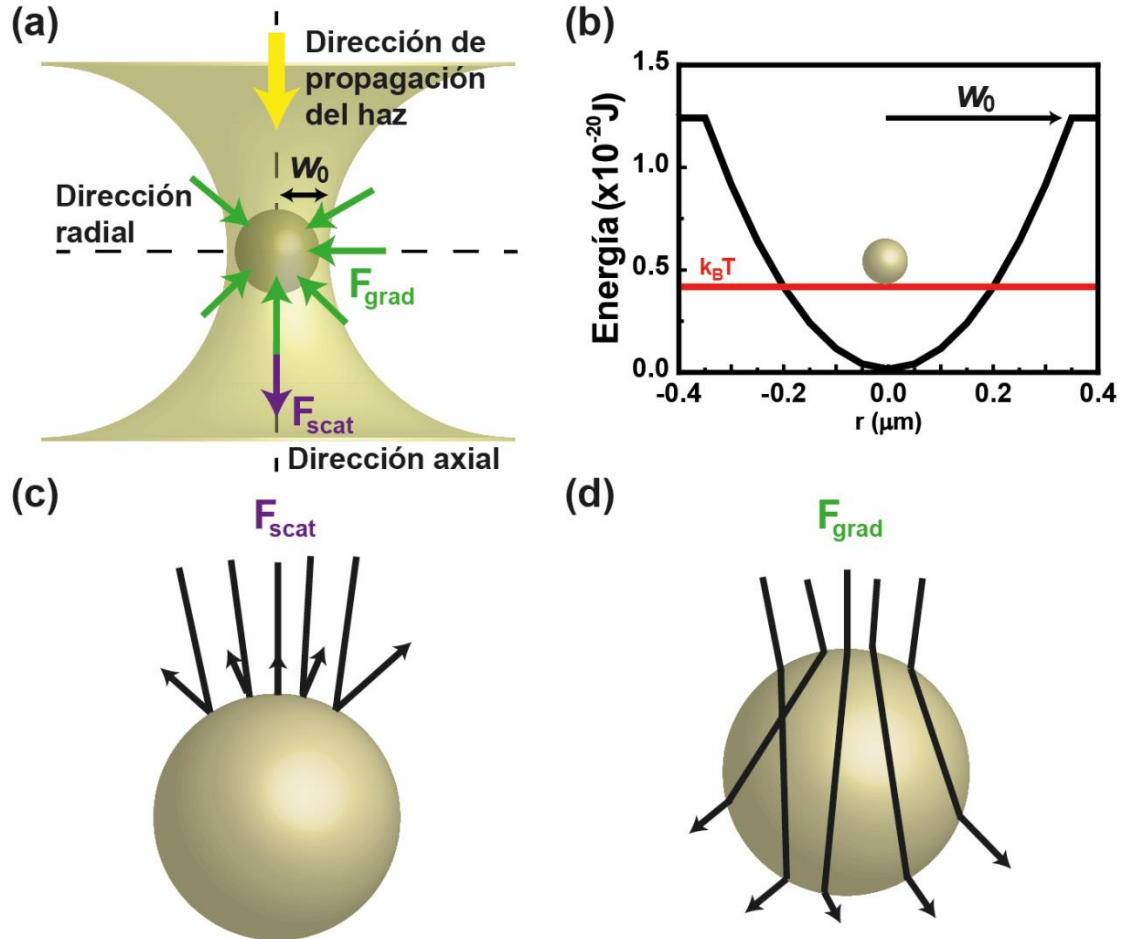


Figura 2.1. Fuerzas ópticas. (a) Representación esquemática de la trampa óptica. (b) Energía del potencial de la trampa para una constante de atrapamiento de $10 \text{ pN}/\mu\text{m}$. Se indica el valor de la energía térmica a 30°C . (c) Representación esquemática de la reflexión de fotones (fuerza de scattering). (d) Representación esquemática de la refracción de fotones (fuerza de gradiente).

La trampa óptica puede visualizarse como un pozo de potencial armónico en el que queda atrapada la partícula (ver **Figura 2.1b**). [1, 2] De esta manera, cuando la partícula se desplace de la posición de equilibrio dentro de la trampa, aparecerá una fuerza restauradora (fuerza óptica, F_{OT}) que intentará devolverla a su posición original. En una primera aproximación, la fuerza óptica vendrá determinada por la ley de Hooke:

$$F_{OT} = K r \quad (2.1)$$

Donde r representa el desplazamiento del objeto atrapado respecto de la posición de equilibrio. La constante de proporcionalidad K recibe el nombre de constante de atrapamiento (*trap stiffness*) y se emplea para caracterizar la trampa óptica. Esta aproximación solo se cumple para pequeños desplazamientos (cientos de nanómetros)

respecto la posición de equilibrio. La fuerza máxima ejercida corresponde con un desplazamiento igual al radio de la trampa (w_0).

Existen dos direcciones espaciales para las que se define un valor de la constante de atrapamiento (ver **Figura 2.1a**): la dirección axial (en la dirección de propagación del haz láser) y la radial (en la dirección perpendicular a la propagación del haz láser). Esta distinción es importante ya que algunos métodos de medida solo permiten medir la componente radial de la fuerza óptica y suele usarse ese valor para caracterizar la trampa óptica en su conjunto. Además, las fuerzas en las direcciones radial y axial no tienen el mismo valor y no dependen de la misma manera de las características de la partícula.

Una partícula atrapada ópticamente alcanza su posición y orientación de equilibrio cuando la fuerza y torque ópticos totales se anulan. Cualquier desviación de esa posición u orientación debido a una fuerza externa, como pueden ser las fluctuaciones térmicas, hará que aparezcan una fuerza y torque que tenderán a devolver a la partícula a su posición y orientación estables. La fuerza óptica es la encargada de mantener a la partícula en la posición de equilibrio dentro de la trampa, mientras que el torque es responsable de orientarla establemente. En este capítulo se describirán los distintos tratamientos teóricos que se siguen para describir las fuerzas y torques ópticos dependiendo del tamaño de la partícula en relación a la longitud de onda del láser que crea la trampa.

La fuerza óptica total que se ejerce sobre una partícula atrapada se ha dividido tradicionalmente en dos componentes: la fuerza de *scattering* y la fuerza de gradiente. Esta división se realiza debido a la aparición de dos fenómenos diferentes cuando una partícula es iluminada por un haz láser.[3] La primera fuerza postulada y descubierta fue la de *scattering* (F_{scat}), que empuja a la partícula en la dirección en la que se propaga el haz (ver **Figura 2.1a**). Esta fuerza está generada por los fotones que son reflejados (**Figura 2.1c**) por la partícula. Sin embargo, se observó que las partículas situadas en las proximidades del haz experimentaban una fuerza, además de la de *scattering*, que las empujaba hacia el eje de propagación de éste. Esta es la fuerza conocida como fuerza de gradiente (F_{grad}) y está generada por los fotones que son difractados por la partícula (**Figura 2.1d**). Esta fuerza atrae a la partícula a la región del haz de mayor intensidad (ver **Figura 2.1a**).

Para que el objeto quede atrapado de manera estable, la fuerza de gradiente en la dirección (y sentido contrario) a la propagación de haz debe ser igual o mayor que la fuerza de *scattering*. Que esto se satisfaga dependerá del volumen del objeto, la intensidad de la luz y las fuerzas térmicas. Este último factor es determinante en el atrapamiento óptico de nanopartículas. En la **Figura 2.1b** se ha representado la energía potencial en función de la distancia para una trampa óptica de constante de atrapamiento de 10 pN/ μm (línea negra). También se ha incluido la energía térmica (línea roja, $k_B T$, con k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura). Debido a las fluctuaciones térmicas, la partícula atrapada se mueve en una cierta región dentro de la trampa óptica. Dependiendo del valor de la energía térmica y la constante de atrapamiento, la partícula quedará más establemente atrapada o menos. Si $k_B T \ll K w_0^2$, la partícula se encuentra fuertemente atrapada y se desplazará muy poco de la posición de equilibrio. Si $k_B T \sim K w_0^2$, la partícula permanece dentro de la trampa, pero accederá a regiones más alejadas del centro de ésta. Esta es la

situación esquemáticamente representada en la **Figura 2.1b**. Si $k_B T > K w_0^2$, la partícula puede escapar del pozo de potencial o, lo que es lo mismo, de la trampa óptica.

El tratamiento teórico de las fuerza ópticas y los resultados experimentales dependen fuertemente de las características de la partícula, tanto del tamaño como del material del que esté compuesta. Por ejemplo, el atrapamiento óptico de partículas metálicas es muy diferente al de las dieléctricas. Durante esta tesis doctoral se ha estudiado este último tipo de partícula, por lo que el tratamiento teórico que se explica a continuación se ha centrado en esos materiales dejando de lado a las partículas metálicas para las que se tienen que tener en cuenta fenómenos especiales.

2.1- Fundamentos teóricos: regímenes de interacción.

Dependiendo del tamaño del objeto en relación a la longitud de onda (λ) del haz láser empleado para crear la trampa óptica, se distinguen tres regímenes de interacción entre la luz (láser de atrapamiento) y la materia (partícula).

2.1a- Micropartículas.

Fuerza óptica.

Cuando el objeto atrapado (de radio R) es mayor que la longitud de onda empleada para crear la trampa óptica ($R > \lambda$), la luz es “capaz de distinguir” que existe una región finita (la partícula) cuyo índice de refracción es distinto al del medio circundante. Estas condiciones corresponden con el llamado régimen de Mie, en el que la óptica de rayos puede emplearse para describir la aparición de la fuerza de atrapamiento.[4]

En la **Figura 2.2a** se puede ver una esfera dieléctrica de índice de refracción mayor que el del medio que la rodea. Los rayos de luz del haz láser (flechas negras) son refractados por la superficie de la partícula, lo que da lugar a un cambio en su momento lineal. Por la tercera ley de Newton, se ejerce un momento sobre la partícula (flechas grises) de igual magnitud que el cambio de momento entre los fotones incidentes y los difractados (ver diagrama **Figura 2.2b**), pero sentido contrario. Se puede ver cómo el momento total transferido apunta hacia la región del foco.

En la **Figura 2.2c** se han representado las dos componentes de la fuerza. En este régimen, la fuerza de gradiente viene determinada por los rayos de luz que forman los extremos del haz y, si el índice de refracción de la partícula es mayor que el del medio, ésta apuntará en la dirección del gradiente de luz.[1, 5] Por otro lado, la componente de *scattering* es principalmente debida a los rayos centrales que empujan a la partícula en la dirección de propagación del haz.

Las componentes de la fuerza óptica son proporcionales al momento total transferido ($n_m P/c$) a la partícula, que es a su vez proporcional a la intensidad de la luz y, por lo tanto, a la potencia (P) del haz de atrapamiento:[6, 7]

$$F_{OT} = Q \frac{n_m P}{c} \quad (2.2)$$

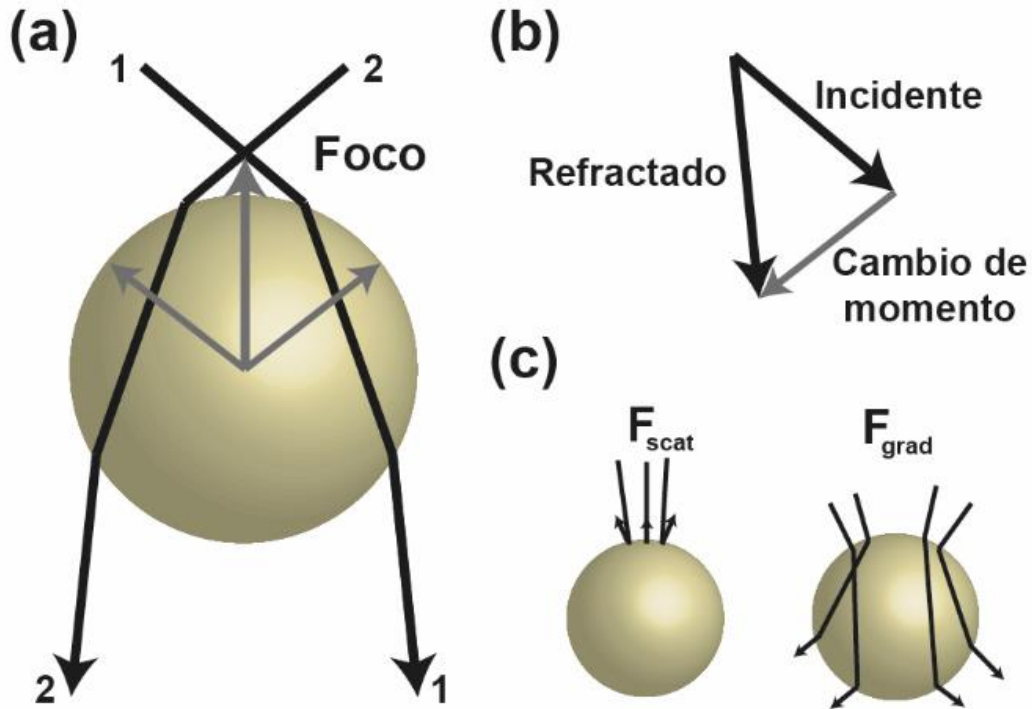


Figura 2.2 Régimen de Mie. (a) Dibujo esquemático de la interacción entre un haz de luz focalizado y la partícula cuando ésta es mucho mayor que la longitud de onda. (b) Esquema del cambio de momento para el rayo 1. (c) Representación del origen de las fuerzas de scattering y gradiente.

En la expresión 2.2, n_m representa el índice de refracción del medio y c , la velocidad de la luz en el vacío. El parámetro Q es adimensional y representa la fracción del momento lineal que ha sido transferida a la partícula. Su valor se emplea para caracterizar cómo de eficiente es la trampa óptica. Es importante destacar que el valor de Q en las direcciones radial y axial no es el mismo. Además, en la dirección radial (Q_r) tampoco tiene un valor constante ya que dependerá de la dirección de polarización del láser. Wright y colaboradores vieron que Q_r es mayor en la dirección de polarización del láser que en la perpendicular a ésta.[7] Esto se debe a que, según las ecuaciones de Fresnel, la luz polarizada a lo largo de plano de incidencia se refleja y transmite de manera distinta que la polarización perpendicular a ésta. Esto hace que el momento transferido a la partícula dependa de la polarización de la luz incidente.

En la **Tabla 2.1** se recogen los valores de Q_r publicados en la literatura para microesferas de distinto tamaño. También se incluyen medidas realizadas durante el desarrollo de esta tesis. Se puede ver que, para una misma apertura numérica y longitud de onda, Q_r aumenta con el tamaño de la partícula.

Para el caso de partículas cuyo tamaño es del orden de micras, se pueden alcanzar fuerzas del orden de decenas de piconewtons, empleando decenas de milivatios de potencia. Si se incrementa el tamaño de la partícula a cientos de micras, la fuerza de atrapamiento que se puede ejercer también aumenta a cientos de piconewtons. Sin embargo, para poder trabajar en ese intervalo de tamaños, no es posible emplear pinzas ópticas de un solo haz

y se requiere una modificación del sistema experimental.[8] Esto es debido a que, en esa escala de tamaños, la masa de la partícula ya no es despreciable y la fuerza de la gravedad desestabiliza la trampa. Por ejemplo, una partícula de sílice ($\rho = 4.6 \text{ g/cm}^3$) de $20 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro tiene un peso de 110 pN , que debe ser sobrepasado por la fuerza óptica para que la partícula pueda ser atrapada establemente en tres dimensiones. Las partículas más grandes ópticamente manipuladas durante esta tesis están compuestas por una matriz de NaYF_4 ($\rho = 4.2 \text{ g/cm}^3$) y tiene un diámetro y grosor de $3 \text{ }\mu\text{m}$ y $1.5 \text{ }\mu\text{m}$, respectivamente. Esto hace que las fuerzas ópticas ejercidas sobre ellas sean suficientes para contrarrestar su peso (0.4 pN).

| Ref. | Material | Forma | Tamaño (μm) | Apertura Numérica | λ (nm) | Q_r |
|------|-----------------|--------|--------------------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | NaYF_4 | Disco | 3×1.5 | 0.55 | 980 | 0.013 ± 0.001 |
| | NaYF_4 | Disco | 3×1.5 | 0.65 | 980 | 0.010 ± 0.001 |
| | NaYF_4 | Disco | 3×1.5 | 0.80 | 980 | 0.017 ± 0.002 |
| [9] | Poliestireno | Esfera | 4.5 | 1.40 | 1064 | 0.144 ± 0.003 |
| [7] | Poliestireno | Esfera | 5 | 1.30 | 1060 | 0.20* |
| [7] | Poliestireno | Esfera | 10 | 1.30 | 1060 | 0.33* |
| [9] | Poliestireno | Esfera | 10 | 1.40 | 1064 | 0.193 ± 0.002 |
| [9] | Poliestireno | Esfera | 15 | 1.40 | 1064 | 0.230 ± 0.003 |
| [7] | Poliestireno | Esfera | 20 | 1.30 | 1060 | 0.37* |

Tabla 2.1 Eficiencias de atrapamiento en la dirección radial. Valores de Q_r para partículas esféricas de distinto tamaño. *Media de los valores en la dirección paralela y perpendicular a la polarización del láser.

Torque óptico.

En esta escala de tamaños, la aparición de torques ópticos que dan lugar a la rotación de partículas puede ser debida a dos fenómenos dependiendo de si la luz transporta o no un momento angular.

Torques ópticos producidos por transferencia momento angular. La luz transporta momento angular de dos tipos: momento angular de spin (MAS), asociado con la polarización, y momento angular orbital (MAO), asociado a la estructura espacial del haz.[10] En cualquiera de los dos casos, la luz transfiere momento angular a la partícula, lo que genera la aparición de un torque óptico. Si la luz solo transporta MAS, el torque óptico se debe a que la luz cambia su estado de polarización al atravesar la micropartícula debido al carácter birrefringente de ésta.[11, 12] Este carácter birrefringente puede ser debido a las propiedades ópticas del material o a su geometría.[12, 13]

Torques ópticos producidos por transferencia de momento lineal. Este fenómeno puede visualizarse como aquel por el que el viento hace girar un molinillo. En este caso, la luz no tiene por qué estar polarizada. Únicamente la geometría de la partícula es responsable de su orientación dentro de la trampa.[14]

Los fenómenos descritos pueden actuar por separado o a la vez a la hora de determinar la orientación estable de la micropartícula dentro de la trampa.

2.1b- Nanopartículas.

Fuerza óptica.

Cuando la partícula es más pequeña que la longitud de onda de atrapamiento ($R < \lambda/20$), el campo electromagnético es constante a lo largo del volumen de la partícula y ésta se puede aproximar por un dipolo moviéndose en un campo electromagnético no homogéneo (luz focalizada).[5, 15, 16] En este régimen, conocido como régimen de Rayleigh, las componentes de la fuerza óptica vienen dadas por:[15]

$$F_{grad} = \frac{1}{2} |\alpha_{NP}| \nabla \langle E_{TRAP}^2 \rangle \quad (2.3)$$

$$F_{scat} = \frac{n_m \langle S \rangle}{c} C_{ext} \quad (2.4)$$

Donde $\langle E_{TRAP}^2 \rangle$ es el promedio temporal del cuadrado del campo eléctrico incidente y $\langle S \rangle$ es el promedio temporal del vector de Pointing. C_{ext} es la sección eficaz de extinción, suma de la secciones eficaces de *scattering* (C_{scat}) y absorción (C_{abs}):[15]

$$C_{ext} = C_{scat} + C_{abs} = \frac{k^4 |\alpha_{NP}|^2}{4\pi} + k \alpha_I \quad (2.5)$$

Donde $k = 2\pi n_m / \lambda_0$. Tanto F_{grad} como F_{scat} dependen de la polarizabilidad (α_{NP}) de la nanopartícula. α_{NP} es un número complejo ($\alpha_{NP} = \alpha_R + i\alpha_I$), suma de una parte real (α_R) y una parte imaginaria (α_I):[17]

$$\alpha_{NP} = \frac{\alpha_0}{1 - i \frac{k^3 \alpha_0}{6\pi \epsilon_0 \epsilon_m}} \approx \alpha_0 + i \frac{|\alpha_0|^2 k^3}{6\pi \epsilon_0 \epsilon_m} \quad (2.6)$$

Donde ϵ_0 y $\epsilon_m = n_m^2$ son la permitividad del vacío y del medio, respectivamente, y

$$\alpha_0 = 4\pi \epsilon_0 V_{NP} \frac{\epsilon_{NP} - \epsilon_m}{\epsilon_{NP} + 2\epsilon_m} \quad (2.7)$$

Siendo V_{NP} el volumen de la partícula y $\epsilon_{NP} = n_p^2$ la permitividad relativa de la partícula (con n_p su índice de refracción). La expresión 2.6 tiene en cuenta, a través del denominador, que el dipolo no es completamente puntual sino que tiene una extensión finita.[17] Para el caso de nanopartículas muy pequeñas que realmente se comportan como dipolos puntuales, la corrección introducida en la expresión 2.6 puede eliminarse y la expresión 2.7 puede emplearse para describir la polarizabilidad de la nanopartícula.[15, 18] Al hacer esto, la parte imaginaria de α_{NP} se desprecia, por lo que únicamente partículas con n imaginario (metálicas) presentan absorción (ver expresión 2.5).

Además, la expresión 2.7 puede modificarse de tal manera que se tenga en cuenta la contribución extra que existe en la polarizabilidad de la partícula por el hecho de que ésta presente un recubrimiento con permitividad (ϵ_c):[19]

$$\alpha_{NP} = 3\epsilon_0 V_{NP} \frac{(\epsilon_c - \epsilon_m)(\epsilon_{nuc} + 2\epsilon_c) + V_{nuc}(\epsilon_{nuc} - \epsilon_c)(\epsilon_m + 2\epsilon_c)}{(\epsilon_c + 2\epsilon_m)(\epsilon_{nuc} + 2\epsilon_c) + V_{nuc}(\epsilon_{nuc} - \epsilon_c)(\epsilon_c + 2\epsilon_m)} \quad (2.8)$$

Donde V_{NP} es el volumen total de la partícula formada por el núcleo (de volumen V_{nuc} y permitividad ϵ_{nuc}) y el recubrimiento.

La expresión 2.3 muestra que F_{grad} es proporcional al cuadrado del campo (i.e. la densidad de energía). F_{grad} , como en el régimen anterior, apunta en la dirección del gradiente y atraerá a la partícula hacia la región de máxima potencia láser (i.e. hacia el centro del foco). Por otro lado, F_{scat} se debe al intercambio de momento lineal entre la luz y la partícula y, como antes, apunta en la dirección y sentido de propagación del haz. En este caso, además del valor relativo entre F_{grad} y F_{scat} , para un atrapamiento óptico estable, hay que tener en cuenta las fluctuaciones térmicas. Las fuerzas ópticas ejercidas sobre nanopartículas son del orden de femtonewtons ($F_{W_0} \sim 10^{-21} \text{J}$), por ello un incremento en la temperatura puede dar lugar a una desestabilización de la trampa si la energía térmica ($k_B T \sim 10^{-21} \text{J}$) es mayor que la del potencial óptico.[20, 21]

La discusión anterior es válida para cualquier tipo de nanopartícula, independientemente del material del que esté compuesta. Sin embargo, las expresiones anteriores pueden simplificarse para partículas dieléctricas. En primer lugar, el índice de refracción (y por consiguiente la permitividad) de las partículas es un número real por lo que estos materiales no presentan absorción haciendo que la sección eficaz de *scattering* sea mucho mayor que la de absorción. De esta manera, para el caso de partículas dieléctricas mucho menores que la longitud de onda de atrapamiento, las expresiones de las dos componentes de la fuerza quedan:

$$F_{grad} = \frac{1}{2} \alpha_0 \nabla \langle E_{TRAP}^2 \rangle \propto V_{NP} \quad (2.9)$$

$$F_{scat} = \frac{n_m \langle S \rangle}{c} \frac{k^4}{4\pi} \alpha_0^2 \propto k^4 V_{NP}^2 \quad (2.10)$$

Se puede ver cómo las componentes escalan de manera distinta con el volumen de la partícula. Para el caso de nanopartículas muy pequeñas ($V_{NP}^2 \ll V_{NP}$), F_{scat} puede despreciarse frente a F_{grad} por lo que la teoría predice que la fuerza óptica total ejercida dependerá linealmente con el volumen de la partícula. Sin embargo se puede ver cómo las fuerzas son proporcionales al valor de la polarizabilidad, la cual no solo depende del volumen de la partícula sino también de las características de la superficie de ésta (ver expresión 2.8). Como se verá en la sección 5.3, las características electrostáticas de la superficie juegan un papel muy importante a la hora de determinar las fuerzas ópticas que actúan sobre partículas nanométricas.

Torque óptico.

En este régimen de tamaños, los torques ópticos vienen determinados por la polarizabilidad de la partícula, al igual que en el caso de las fuerza ópticas.[5, 22] La polarización inducida (IP) en la partícula es:

$$IP = \chi E_{TRAP} \quad (2.11)$$

Donde $\chi = \epsilon_{NP} - 1$ es la susceptibilidad eléctrica de la partícula y E_{TRAP} el campo eléctrico del haz incidente. Estudios publicados constatan que la aparición de torques ópticos es debida a que la polarización inducida en la partícula por el campo incidente no es paralela a éste. En este caso, el torque óptico (Γ) viene dado por:[23]

$$\Gamma = \int \mathbf{IP} \times \mathbf{E}_{TRAP} dx^3 \quad (2.12)$$

La orientación estable (torque nulo) se dará cuando la polarización inducida y el campo se alineen. Se han identificado dos mecanismos principales que dan lugar a una no alineación del campo y la polarización inducida.[13, 24]

Carácter birrefringente.[12, 23] Un material es birrefringente cuando posee índices de refracción distintos a lo largo de direcciones espaciales distintas, lo que da lugar a ejes ópticos en el cristal. Esto hace que la susceptibilidad no sea isotrópica, existiendo un valor de polarizabilidad distinto dependiendo de la dirección de propagación dentro del cristal. En estos casos, la polarización inducida viene dada por:

$$\mathbf{IP} = (\chi_x E_{TRAP_x}, \chi_y E_{TRAP_y}, \chi_z E_{TRAP_z}) \quad (2.13)$$

Donde los subíndices indican las tres direcciones (X, Y, Z) dentro del cristal. En esta situación, el valor de torque no será nulo ya que $\chi_x \neq \chi_y \neq \chi_z$.

Geometría no esférica.[10, 22, 25, 26] En este caso de partículas no esféricas existe una polarización inducida efectiva que es no isotrópica cuya orientación espacial depende fuertemente de la orientación relativa entre el campo eléctrico incidente y el eje geométrico de la partícula.

2.1c- Partículas comparables a la longitud de onda.

Fuerza óptica.

En multitud de estudios se emplean partículas cuyo tamaño es comparable a la longitud de onda de atrapamiento. En estos casos ya no es posible describir la partícula como un dipolo ni tampoco puede aplicarse la descripción de Mie, por lo que hay que generalizar el tratamiento del problema. Para ello se emplea la electrodinámica clásica. La fuerza óptica que actúa sobre la partícula se puede obtener integrando el tensor de Maxwell ($T(r, t)$) sobre una superficie arbitraria (A) que engloba a la partícula:

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \oint_A \langle \mathbf{T}(r, t) \rangle \mathbf{n}(r) da \quad (2.14)$$

Donde $\mathbf{n}(r)$ es un vector unitario normal a la superficie, los corchetes indican promedio en el tiempo y el tensor de Maxwell viene dado por:

$$T_{ij} = \left[\epsilon_0 \epsilon E_i E_j + \mu_0 H_i H_j - \frac{1}{2} (\epsilon_0 \epsilon E^2 + \mu_0 H^2) \delta_{ij} \right] \quad (2.15)$$

Donde ϵ es la permitividad de la partícula, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío, E_i y H_i son las componentes i de los campos eléctrico y magnético en la superficie de integración, E y H los valores absolutos de los campos y δ_{ij} es la delta de Kronecker.

En este intervalo de tamaños la fuerza ya no tiene una relación lineal con el volumen del objeto como ocurre en los otros regímenes. En este caso, hay que tener en cuenta el cociente entre el tamaño de la partícula y la anchura de la trampa. Existen diferentes trabajos que muestran que la fuerza de atrapamiento es máxima cuando el tamaño de la

partícula es del orden del tamaño del foco láser.[2, 27] Las fuerzas ópticas que se pueden ejercer en este intervalo de tamaños de partícula son del orden de piconewtons.

Torque ópticos.

Cuando la partícula tiene un tamaño del orden de la longitud de onda de atrapamiento, los torque ópticos pueden explicarse empleando tanto el formalismo descrito para las partículas menores que la longitud de onda, como los fenómenos físicos detallados para el caso de micropartículas.

Al igual que la fuerza, el torque puede obtenerse a través del tensor de Maxwell:

$$\langle \Gamma \rangle = - \langle \oint_A (\mathbf{T}(r, t) \times \mathbf{r}) \mathbf{n}(r) da \rangle \quad (2.16)$$

Para el caso concreto en el que la partícula se comporta como un dipolo eléctrico (\mathbf{u}_e) y magnético (\mathbf{u}_m), el torque puede calcularse como:

$$\Gamma = \frac{1}{2} \Re[(\mathbf{u}_e \times \mathbf{E}^*) + \mathbf{u}_m \times c\mathbf{B}^*] \quad (2.17)$$

Donde \Re representa la parte real, \mathbf{E}^* y \mathbf{B}^* son los complejos conjugados de los campos. Los dipolos vienen determinados por:

$$\mathbf{u}_e = \frac{i}{\omega} \int \mathbf{j} dr^3 \quad (2.18)$$

$$\mathbf{u}_m = \frac{1}{2c} \int \mathbf{r} \times \mathbf{j} dr^3 \quad (2.19)$$

Donde ω es la frecuencia de la radiación y \mathbf{j} la corriente de desplazamiento asociada al campo eléctrico dentro de la partícula:

$$\mathbf{j} = -i\omega\epsilon_0\chi\mathbf{E} \quad (2.20)$$

2.2- Calibración de la trampa óptica.

En este apartado se describen los distintos métodos que pueden emplearse para calibrar la trampa óptica. Con ellos se obtiene un valor para la constante de atrapamiento (*trap stiffness*, K) con la que puede determinarse la fuerza óptica aplicada.

Los métodos de calibración pueden dividirse en métodos activos, pasivos o directos.[28] Los métodos pasivos permiten calibrar la trampa cerca de la posición estable (pequeños desplazamientos), mientras que los métodos activos permiten, además, determinar la región donde K es constante (comportamiento lineal de la fuerza a distancias largas).[29] En el capítulo 4 se puede encontrar información más detallada para la implementación y uso de los métodos de calibración.

2.2a- Métodos activos.

Los métodos activos son aquellos en los que la fuerza óptica, para una cierta potencia, se obtiene comparándola con una fuerza externa conocida.[28] La mayoría de los experimentos de atrapamiento óptico se realizan dentro de fluidos como pueden ser el agua o cualquier otro disolvente donde las partículas estén dispersadas. Las partículas, al

desplazarse dentro del fluido, sufren una fuerza denominada fuerza de arrastre o rozamiento que se opone a su movimiento. Esta fuerza es la que se emplea para calibrar la trampa óptica mediante el método hidrodinámico.[20] La fuerza de arrastre (F_d) ejercida sobre la partícula por el fluido en movimiento es proporcional a la velocidad relativa (v) entre el fluido y la partícula y al coeficiente de rozamiento (β):

$$F_d = \beta v \quad (2.21)$$

Cuando la partícula se mueve dentro el fluido, la fuerza de rozamiento hace que abandone su posición de equilibrio. Si la velocidad es moderada y no se alcanza la velocidad de escape (v_{esc}) a la que la partícula se libera de la trampa, ésta alcanza una nueva posición estable (r_{eq}) (ver **Figura 2.3a**), que vendrá determinada por el equilibrio entre dicha fuerza de rozamiento y la fuerza óptica restauradora. Usando las expresiones 2.1 y 2.21 se obtiene que el desplazamiento respecto a la posición de equilibrio (r_{eq}) para una cierta velocidad vendrá dado por:

$$F_{OT} = F_d \rightarrow r_{eq} = \frac{\beta}{K} v \quad (2.22)$$

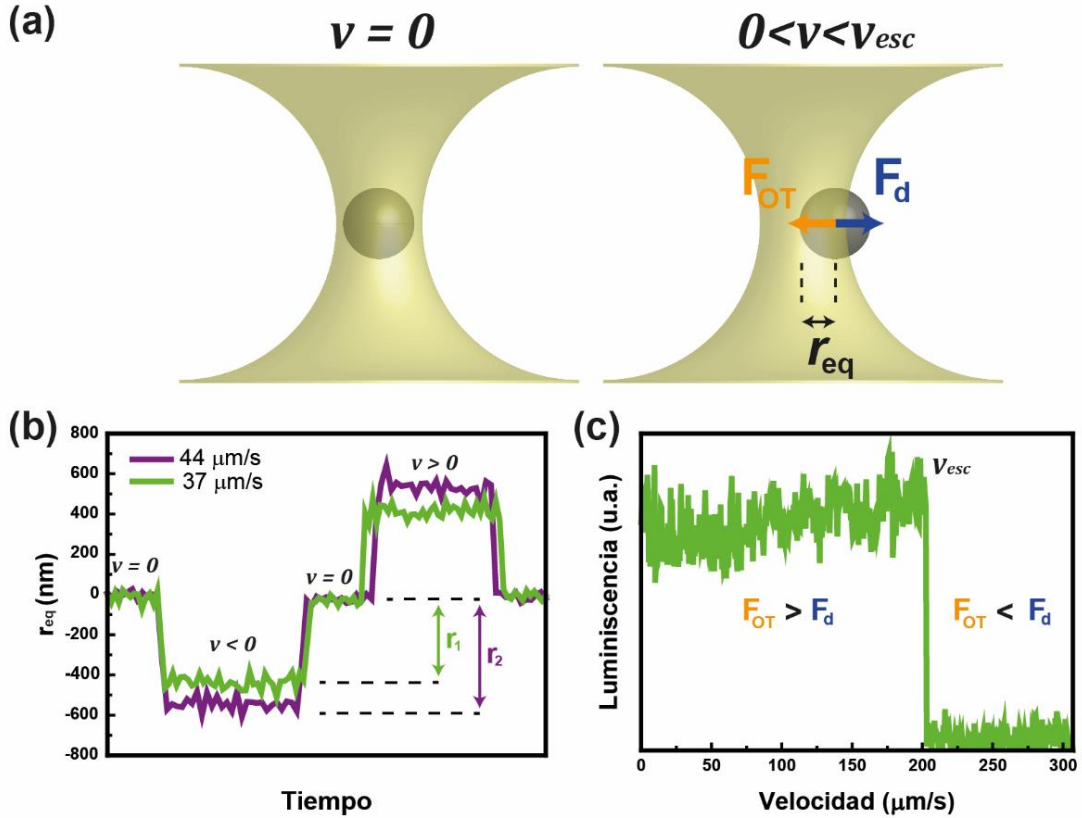


Figura 2.3 Método hidrodinámico lineal. (a) Para una velocidad nula (izquierda), la partícula permanece en la posición de equilibrio. Cuando la velocidad es no nula y menor que la velocidad de escape (derecha), la nueva posición de equilibrio está desplazada una distancia r_{eq} del centro de la trampa. (b) Representación de la medida del desplazamiento en método de velocidades moderadas ($v < v_{esc}$). (c) Representación del método basado en la velocidad de escape para partículas luminiscentes.

Por lo tanto, conociendo el coeficiente de rozamiento (ver sección 4.2c) y la velocidad, se puede obtener un valor de K si se mide el desplazamiento de la partícula respecto de la posición de equilibrio.

La generación de una velocidad relativa entre la partícula atrapada y el fluido puede conseguirse tanto moviendo la partícula, o lo que es lo mismo, la trama óptica, como moviendo el fluido que rodea la partícula usando una plataforma motorizada. Existen tres métodos hidrodinámicos, los cuales se describen a continuación.

Métodos hidrodinámicos lineales.

Estos métodos se basan en generar un desplazamiento lineal entre la partícula y el fluido a una velocidad controlada. Cuando la velocidad es moderada ($v < v_{esc}$), el desplazamiento respecto a la posición de equilibrio es pequeño (cientos de nanómetros), por lo que la partícula permanece dentro de la trampa. El procedimiento experimental consiste en la medida, para una misma potencia láser, el valor de r_{eq} para diferentes velocidades. De la pendiente de la recta de r_{eq} frente a la velocidad (expresión 2.22) se obtiene el valor de K para la potencia empleada. Repitiendo el proceso completo para distintas potencias, se obtiene el valor de K para cualquier potencia dada. La **Figura 2.3b** recoge una medida experimental del valor de r_{eq} para dos velocidades distintas. Puede verse cómo el desplazamiento de la partícula depende de la velocidad. Cuanto más alta sea ésta, mayor será el desplazamiento ($r_2(44 \mu\text{m/s}) > r_1(37 \mu\text{m/s})$). En este experimento también se comprobó que el valor de r_{eq} es independiente del sentido del movimiento.

Este método requiere medir el desplazamiento de la partícula con gran precisión, por lo que se necesita una calibración espacial del sistema experimental (ver sección 4.2b). En el caso de partículas cuyo tamaño puede resolverse ópticamente, suelen usarse cámaras ópticas con gran resolución espacial. En el caso de nanopartículas que se encuentran por debajo del límite de resolución, es necesario emplear otros métodos de medida basados en, por ejemplo, el uso de un fotodiodo de cuadrantes (ver sección 4.2b).

Cuando la velocidad es alta, la partícula puede liberarse de la trampa si la fuerza de rozamiento supera a la fuerza óptica máxima ejercida en el límite de la trampa. En este hecho se basa el método de la medida de la velocidad de escape. En este caso se busca la velocidad máxima (v_{esc}) a la que la partícula permanece atrapada. Como ahora r es igual al radio de la trampa óptica (radio del foco láser, w_0), no es necesario medir el desplazamiento de la partícula. En este método solo hay que determinar v_{esc} para distintas potencias. Posteriormente se obtiene el valor de K empleando:

$$K = \frac{\beta}{w_0} v \quad (2.23)$$

Con el método de la velocidad de escape se busca liberar la partícula de la trampa. Esto hace que la partícula acceda a las regiones más externas de la trampa óptica donde la aproximación de potencial armónico comienza a fallar.

Finalmente, este método es especialmente útil cuando se estudian nanopartículas luminiscentes, ya que es experimentalmente sencillo determinar si la partícula se encuentra atrapada o no. Para velocidades moderadas ($v < v_{esc}$), la partícula luminiscente se mantiene dentro de la trampa, por lo que su luminiscencia es excitada por el haz láser

y puede ser detectada (ver **Figura 2.3c**). Cuando la velocidad supera a la de escape, la partícula se libera de la trampa y el valor de la luminiscencia cae a cero. La detección o no de luminiscencia en la región de la trampa es un indicativo de si la partícula permanece o no atrapada.

Método hidrodinámico sinusoidal.

En este método se genera un movimiento relativo oscilatorio entre la partícula y el fluido. Este procedimiento presenta una mayor complejidad que los métodos lineales, ya que requiere un control preciso tanto de la amplitud como de la frecuencia de oscilación. Al igual que antes, la partícula está sujeta a la fuerza de rozamiento, que se opone a su movimiento, y a la fuerza óptica que intentará devolverla a la posición de equilibrio. Esta última es proporcional a la distancia entre la posición de la partícula y el centro de la trampa, que oscila con una amplitud y frecuencia determinadas. En este caso, la constante de atrapamiento se determina midiendo la amplitud de la oscilación de la partícula atrapada o el desfase.[4, 5]

2.2b- Métodos Pasivos.

Como se explicó al comienzo del capítulo, incluso cuando se encuentra atrapada ópticamente, una partícula inmersa en un fluido está sujeta al movimiento browniano (i.e. el movimiento de la partícula debido a las colisiones de ésta con las moléculas del disolvente). En estas condiciones, la partícula podrá moverse, pero únicamente dentro de una región dentro de la rampa que vendrá determinada por el valor de K . En la **Figura 2.4** se muestran las posiciones visitadas por una partícula atrapada para diferentes potencias. Cuanto mayor es la potencia aplicada, menor es la región en la que se mueve la partícula.

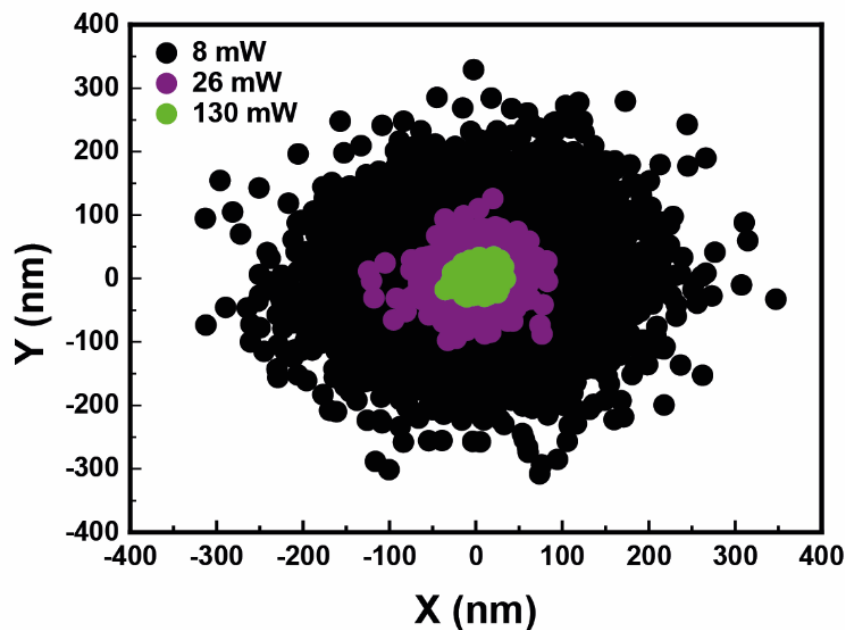


Figura 2.4 *Movimiento browniano en el interior de la trampa óptica. Posiciones visitadas por una partícula atrapada empleando diferentes potencias láser. A mayor potencia, menor es la región en la que la partícula puede desplazarse.*

Los métodos de calibración pasivos se basan en el análisis de las fluctuaciones térmicas de la partícula atrapada.[28] Podemos encontrar tres procedimientos experimentales distintos que, aunque se basan en el mismo fenómeno físico, difieren en el material experimental y el procedimiento de análisis necesarios para desarrollarlos.

Método de la estadística de Boltzmann.

Este método se basa en la determinación de la distribución completa de posiciones visitadas por la partícula dentro de la trampa óptica.[5] La probabilidad de encontrar a la partícula en una posición dada, cuando ésta está sujeta a un potencial y al movimiento browniano, viene determinada por la estadística de Boltzmann. Si el potencial es armónico ($U(x_i) = Kx_i^2$), la distribución de probabilidades $Prob(x_i)$ es una gaussiana parametrizada por K :

$$Prob(x_i) \propto e^{\frac{-Kx_i^2}{2k_B T}} \quad (2.24)$$

En este caso x_i es el desplazamiento de la partícula respecto de la posición de equilibrio en una de las tres direcciones $i = x, y, z$. En este caso, K se obtiene de la reconstrucción del potencial de la trampa.[2, 5] En primer lugar se miden los desplazamientos respecto a la posición de equilibrio y se obtiene el histograma de posiciones. Con él se calcula $Prob(x_i)$ y se normaliza dividiéndola por su valor máximo. Posteriormente se obtiene la forma del potencial de la trampa a través de:

$$U(x_i) = Kx_i^2 = -2k_B T \ln(Prob(x_i)) \quad (2.25)$$

La normalización de $Prob(x)$ hace que el valor mínimo del potencial sea cero. Del ajuste del $U(x)$ calculado se obtiene el valor de K . Este método no necesita que se conozca β , sin embargo, necesita una buena calibración en posiciones del sistema de atrapamiento.

Método de equipartición.

El método de equipartición establece que cada grado de libertad de la partícula tiene una energía igual a $\frac{1}{2}k_B T$. Para el caso de un potencial armónico se tiene que:

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}K\langle x_i^2 \rangle \quad (2.26)$$

Este método es análogo al de la estadística de Boltzmann, pero en este caso únicamente es necesario determinar la varianza ($\langle x_i^2 \rangle$) de la posición de la partícula.[5] Para poder obtenerla, es necesario medir con alta resolución, tanto espacial como temporal, todas las posiciones visitadas por la partícula durante un cierto periodo de tiempo. Como en el método anterior, β no es necesario, pero sí una calibración en posiciones.

Método PSD.

El método PSD (*power spectral density*) emplea el espectro de potencias del movimiento browniano de la partícula atrapada para determinar K . En este caso se analizan las fluctuaciones térmicas en el espacio de frecuencias. El movimiento de una partícula sujeta al movimiento browniano viene dada por la ecuación de Langevin:[30]

$$M \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = -\beta \frac{dx_i(t)}{dt} + F_{th}(t) \quad (2.27)$$

Donde M es la masa de la partícula y $F_{th}(t)$ es la fuerza que inducen las fluctuaciones térmicas y que hace vibrar a la partícula. Cuando la partícula está también sujeta al potencial armónico de la trampa, la teoría de Einstein-Ornstein-Uhlenbeck describe el movimiento siguiendo una ecuación de Langevin derivada de la anterior:[31]

$$M \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = -\beta \frac{dx_i(t)}{dt} + Kx_i(t) + (2K_B T \beta)^{\frac{1}{2}} \eta(t) \quad (2.28)$$

Donde $F_{th}(t) = (2K_B T \beta)^{\frac{1}{2}} \eta(t)$ representa las fuerzas brownianas a una temperatura (T) dada. El término de inercia (izquierda) puede eliminarse ya que la resolución temporal de los aparatos de medida no permite medir el proceso de pérdida de energía cinética debido a la fricción, cuyo tiempo característico es m/β (1 ns para una esfera de sílice de 1 μm de diámetro a temperatura ambiente). La expresión anterior puede reescribirse como:

$$\frac{dx_i(t)}{dt} + 2\pi f_c x_i(t) = (2D)^{\frac{1}{2}} \eta(t) \quad (2.29)$$

Donde f_c , es la frecuencia de corte:

$$f_c = \frac{K}{2\pi\beta} \quad (2.30)$$

Y D es el coeficiente de difusión de la partícula, que se relaciona con la energía de Boltzmann y β a través de la ecuación de Einstein-Smolachowski:[32]

$$D = \frac{k_B T}{\beta} \quad (2.31)$$

El método de PSD consiste en medir las posiciones de la partícula ($x_i(t)$) durante un periodo de tiempo (t_{total}). Después se calcula la transformada de Fourier de esos datos (\tilde{x}_{i_k}) y se obtiene con ella el espectro de potencias $|\tilde{x}_{i_k}|^2/t_{total}$. Finalmente, el valor esperado del espectro de potencias es una lorenciana de la forma:

$$Pot(f) = \frac{D}{2\pi^2} \frac{1}{f_c^2 + f^2} \quad (2.32)$$

Mediante el ajuste del espectro de potencias medido a la expresión 2.32, se puede obtener un valor para la frecuencia de corte que, a su vez, permite determinar el valor de K (expresión 2.30). Es importante añadir que es necesario realizar el ajuste en el intervalo de frecuencias correcto con el fin de minimizar los errores sistemáticos del sistema como el ruido de baja frecuencia externo al experimento o el hecho de que la aproximación a una lorenciana sólo sea válida para $f^2 \ll (f_{exp}/2)^2$ con f_{exp} es el ancho de banda del detector.[31] El proceso se puede realizar para diferentes potencias con el fin de obtener un valor de K para cualquier potencia dada. En la **Figura 2.5** se muestran cinco espectros de potencia obtenidos para diferentes potencias de atrapamiento. Se puede ver que, a mayor potencia láser, mayor es el valor de f_c medio. Al contrario que en los métodos pasivos anteriores, no es necesaria una calibración en posiciones ya que el espectro de potencias de la partícula puede medirse directamente a través de un fotodiodo de cuadrantes (sección 4.2b). Sin embargo, si el sistema experimental ha sido calibrado, se

puede obtener una medida de β a través del coeficiente de difusión (expresión 2.31) empleando la constante de proporcionalidad obtenida al ajustar el espectro de potencias (expresión 2.32). Si éste no es el caso, es necesario conocer el coeficiente de rozamiento de la partícula atrapada.

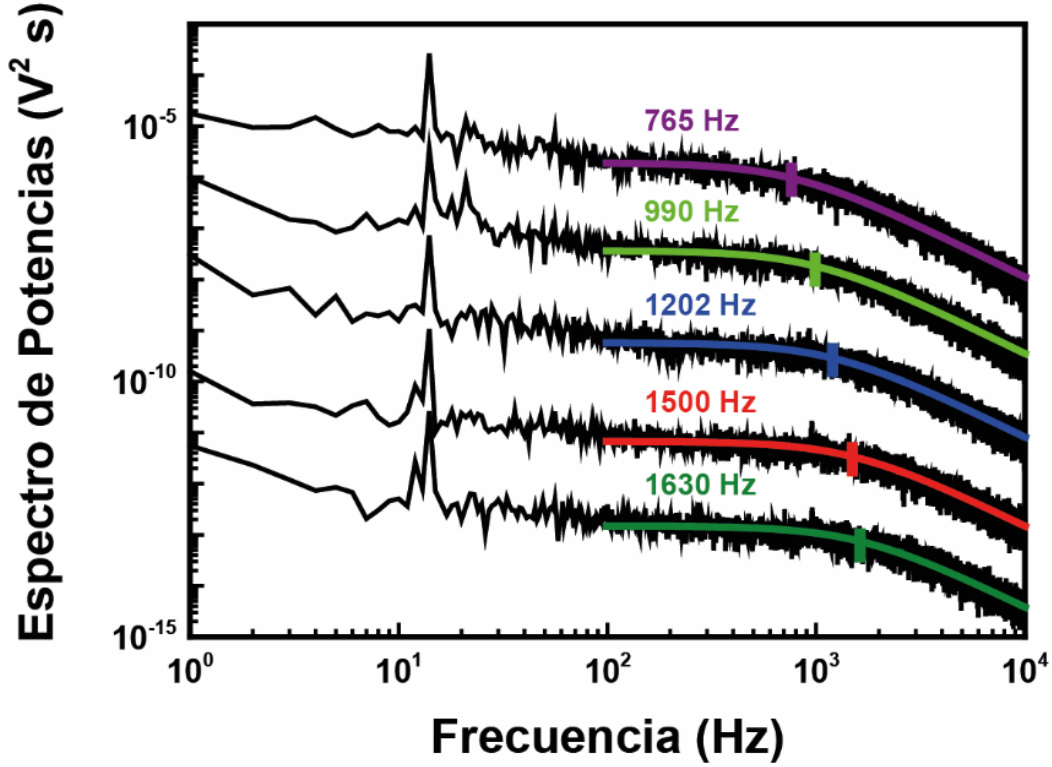


Figura 2.5 Método PSD. Cinco espectros de potencias medidos para cinco potencias láser distintas (28, 36, 42, 50, y 58 mW). Todos se han ajustado a la expresión 2.32 obteniéndose valores crecientes de la frecuencia de corte al aumentar la potencia láser.

2.2c- Métodos directos.

La fuerza óptica es proporcional a la transferencia de momento entre el haz láser y el objeto atrapado. El método directo determina la fuerza de atrapamiento mediante la medida del cambio de momento de la luz dispersada por la partícula.[33] El cambio de momento es proporcional a desviación (X) que sufre el haz al atravesar la partícula atrapada, por lo que la fuerza óptica puede obtenerse de:[34]

$$F_{OT} = \frac{I AN}{c \phi} X \quad (2.33)$$

Donde AN y ϕ son la apertura numérica del objetivo de detección y su apertura trasera, respectivamente, e I la intensidad del haz. Se pueden emplear cámaras o detectores de cuadrantes para hacer una imagen de la distribución de la luz dispersada por la partícula. Este método requiere la detección de toda la luz dispersada, lo que incrementa la complejidad experimental haciendo que el método no sea muy usado.[28]

2.2d- Comparación de los métodos.

En la **Tabla 2.2** se recogen las características más importantes de los métodos activos y pasivos. La complejidad experimental se ha clasificado en baja, media y alta teniendo en cuenta tanto el material como el tratamiento posterior de datos necesarios.

| | Activos (hidrodinámicos) | | | Pasivos | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------|----------------|----------|----------|
| | Lineales | | | | | |
| | Velocidad escape | Velocidad moderada | Sinusoidal | PSD | EQ | BS |
| Complejidad experimental | Baja | Media | Alta | Alta | Media | Alta |
| Coefficiente rozamiento | Sí | Sí | Sí | Sí* | No | No |
| Calibración espacial | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí |
| Dirección de calibración | Radial | Radial | Radial | Todas | Todas | Todas |
| Intervalo de tamaños** | Todos | Todos | Todos | Todos | Pequeños | Pequeños |
| Intervalo de potencias** | Alta | Alta | Alta | Medias y bajas | Bajas | Bajas |

Tabla 2.2 Comparación de los métodos de calibración de la trampa óptica. *No necesario si se hace una calibración en posiciones. **Intervalo óptimo de trabajo del método de medida.[28] Altas potencias, > 1 W, baja, < 0.2 W.[28] EQ, método de equipartición; BS, método de la estadística de Boltzmann.

Una de las principales diferencias entre los métodos de calibración descritos es el material experimental que requieren. Por ejemplo, para implementar el método hidrodinámico lineal de la velocidad de escape son necesarias una cámara y una plataforma motorizada calibrada en velocidades. Sin embargo, para el método PSD, es necesario instalar un fotodiodo de cuadrantes con el fin de poder medir el espectro de potencias de las fluctuaciones de la partícula. Este último método requiere, además, una preparación del equipo mucho más precisa y larga que en el primer caso.

También existe una diferencia en la complejidad del tratamiento posterior de datos. En el caso del método hidrodinámico de velocidad de escape, la fuerza máxima de la trampa óptica se puede calcular de manera directa a través de la velocidad máxima medida. El cálculo es también directo en el método de equipartición en el que, una vez medidas las posiciones de la partícula, sólo hay que calcular su varianza. Por otro lado, los métodos como el PSD o el de la estadística de Boltzmann requieren un tratamiento posterior de datos complejo, aunque, para el caso del método PSD, los aparatos de medida necesarios ya incorporen el software necesario para ello.

Por otro lado, tanto los métodos hidrodinámicos como el método de PSD requieren que se conozca el coeficiente de rozamiento de la partícula, que depende de la geometría de ésta y de la viscosidad del medio (ver sección 4.2c). Esto es una desventaja frente a los métodos de equipartición y de estadística de Boltzmann, que no lo requieren, en el caso de que el objeto atrapado no sea esférico o la viscosidad del medio no se conozca.

La necesidad de una calibración en posiciones puede aumentar la imprecisión de la medida. Los métodos de equipartición, estadística de Boltzmann y el método hidrodinámico de velocidades moderadas requieren una calibración en distancias que, si no se realiza correctamente, puede hacer que se sobreestime o subestime el valor de K . [28]

La temperatura, aun siendo un parámetro determinante en todos ellos, afecta de manera distinta a los diferentes métodos. Por ejemplo, una estimación errónea de la temperatura en la región de la trampa puede hacer que se sobreestime el valor del coeficiente de rozamiento. Esto haría que el valor de K medido por los métodos hidrodinámicos aumente, pero que decrezca en el caso del método PSD. [28]

Finalmente, es importante destacar que el valor de la constante de atrapamiento estimado para la misma partícula en las mismas condiciones experimentales depende del método empleado, cosa que no ocurre con su orden de magnitud. [28] Estas discrepancias se atribuyen al error experimental asociado a cada uno de ellos. Sarshar y colaboradores realizaron un estudio comparativo entre los métodos de PSD, estadística de Boltzmann, hidrodinámico de velocidades moderadas y equipartición. [28] Concluyeron que el intervalo de tamaños de partícula y de potencias en el que permiten estimar un valor preciso de K difiere entre procedimientos de medida (ver **Tabla 2.1**). Esto lo atribuyeron a los diferentes requerimientos experimentales de cada método. Por esta razón se debe tener especial cuidado al comparar valores de K medidos empleando distintos procedimientos. Sin embargo, la combinación de varios de ellos permite eliminar las desventajas y explotar todas las capacidades del atrapamiento óptico. [35, 36]

2.3- Referencias.

1. A. Ashkin, *Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure*. Physical Review Letters, 1970. **24**(4): p. 156.
2. B. Paul and H. Stuart, *Three-dimensional force calibration of a single-beam optical gradient trap*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2002. **14**(33): p. 7757.
3. A. Ashkin, *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(10): p. 4853.
4. K. Svoboda and S. M. Block, *Biological applications of optical forces*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994. **23**: p. 247.
5. K. C. Neuman and S. M. Block, *Optical trapping*. Review of Scientific Instruments, 2004. **75**(9): p. 2787.
6. A. Ashkin, *Forces of a Single-Beam Gradient Laser Trap on a Dielectric Sphere in the Ray Optics Regime*. Biophysical Journal, 1992. **61**(2): p. 569.
7. W. H. Wright, et al., *Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers*. Applied Optics, 1994. **33**(9): p. 1735.
8. R. W. Applegate, et al., *Particle size limits when using optical trapping and deflection of particles for sorting using diode laser bars*. Optics Express, 2009. **17**(19): p. 16731.
9. N. Khatibzadeh, et al. *Effects of media viscosity and particle size on optical trapping of microspheres*. in *Conference on Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII*. 2014. San Francisco, CA: SPIE.
10. A. I. Bishop, et al., *Optical application and measurement of torque on microparticles of isotropic nonabsorbing material*. Physical Review A, 2003. **68**(3): p. 033802.
11. M. E. J. Friese, et al., *Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles*. Nature, 1998. **394**(6691): p. 348.

12. Z. Cheng, et al., *Light Streak Tracking of Optically Trapped Thin Microdisks*. Physical Review Letters, 2002. **89**(10): p. 108303.
13. T. A. Nieminen, et al., *Symmetry and the generation and measurement of optical torque*. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 2009. **110**(14–16): p. 1472.
14. P. Galajda and P. Ormos, *Rotors produced and driven in laser tweezers with reversed direction of rotation*. Applied Physics Letters, 2002. **80**(24): p. 4653.
15. P. M. Bendix, et al., *Optical Trapping of Nanoparticles and Quantum Dots*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2014. **20**(3): p. 15.
16. M. Dienerowitz, et al., *Optical manipulation of nanoparticles: a review*. Journal of Nanophotonics, 2008. **2**(1): p. 021875.
17. O. M. Marago, et al., *Optical trapping and manipulation of nanostructures*. Nat Nano, 2013. **8**(11): p. 807.
18. A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer, *Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields*. Journal of the Optical Society of America A, 2001. **18**(4): p. 839.
19. C. F. Bohren and D. R. Huffman, *Particles Small Compared with the Wavelength, in Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH. p. 130.
20. A. Ashkin, et al., *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. Optics Letters, 1986. **11**(5): p. 288.
21. P. Haro-Gonzalez, et al., *Optical trapping of NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺ upconverting fluorescent nanoparticles*. Nanoscale, 2013. **5**(24): p. 12192.
22. M. Li, et al., *Optical trapping force and torque on spheroidal Rayleigh particles with arbitrary spatial orientations*. Journal of the Optical Society of America A, 2016. **33**(7): p. 1341.
23. A. La Porta and M. D. Wang, *Optical Torque Wrench: Angular Trapping, Rotation, and Torque Detection of Quartz Microparticles*. Physical Review Letters, 2004. **92**(19): p. 190801.
24. O. Emile and J. Emile, *Rotation of millimeter-sized objects using ordinary light*. Optics Letters, 2016. **41**(2): p. 211.
25. F. Xu, et al., *Radiation torque exerted on a spheroid: Analytical solution*. Physical Review A, 2008. **78**(1): p. 013843.
26. F. Borghese, et al., *Radiation Torque and Force on Optically Trapped Linear Nanostructures*. Physical Review Letters, 2008. **100**(16): p. 163903.
27. A. Rohrbach, *Stiffness of Optical Traps: Quantitative Agreement between Experiment and Electromagnetic Theory*. Physical Review Letters, 2005. **95**(16): p. 168102.
28. M. Sarshar, et al., *Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers*. Journal of Biomedical Optics, 2014. **19**(11).
29. K. C. Neuman and A. Nagy, *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*. Nat Meth, 2008. **5**(6): p. 491.
30. D. S. Lemons and A. Gythiel, *Paul Langevin's 1908 paper "On the Theory of Brownian Motion" ["Sur la théorie du mouvement brownien," C. R. Acad. Sci. (Paris) 146, 530–533 (1908)]*. American Journal of Physics, 1997. **65**(11): p. 1079.
31. K. Berg-Sørensen and H. Flyvbjerg, *Power spectrum analysis for optical tweezers*. Review of Scientific Instruments, 2004. **75**(3): p. 594.
32. M. A. Islam, *Einstein–Smoluchowski Diffusion Equation: A Discussion*. Physica Scripta, 2004. **70**(2-3): p. 120.
33. G. Thalhammer, et al., *Direct measurement of axial optical forces*. Optics Express, 2015. **23**(5): p. 6112.
34. S. B. Smith, et al., *Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules*. Science, 1996. **271**(5250): p. 795.
35. A. Buosciolo, et al., *New calibration method for position detector for simultaneous measurements of force constants and local viscosity in optical tweezers*. Optics Communications, 2004. **230**(4-6): p. 357.
36. J. Mas, et al., *Quantitative determination of optical trapping strength and viscoelastic moduli inside living cells*. Physical Biology, 2013. **10**(4).

CAPÍTULO 3: Procesos de *upconversion.*

En este capítulo se va a introducir el fenómeno de *upconversion*, por el que ciertos sistemas pueden generar luz de mayor energía que la radiación que absorben. En concreto, la discusión se va a centrar en los iones lantánidos Er^{3+} e Yb^{3+} ya que esta tesis se basa en el atrapamiento óptico de partículas dopadas con este tipo de iones. Además de discutir diferentes aspectos del proceso de *upconversion*, se van a analizar los parámetros que pueden influir en él, como son el tamaño, forma y composición de las partículas y la temperatura. Las características excepciones que presentan las partículas de *upconversion* han permitido su uso tanto en estudios fundamentales como en aplicaciones biológicas, como se verá en el capítulo 5.

3.1- Mecanismos de *upconversion* en sistemas $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$.

Luminiscencia es el término que define la emisión de luz por parte de un sistema que ha sido excitado por alguna forma de energía.[1, 2] La emisión de luz se produce cuando el sistema se desexcita de manera radiativa desde un estado excitado a un estado de menor energía. Existen diferentes tipos de luminiscencia dependiendo de la fuente de energía que la genere. Por ejemplo, podemos encontrar la quimioluminiscencia producida por reacciones químicas, la termoluminiscencia generada por el hecho de que el cuerpo se encuentre a una temperatura dada o la catodoluminiscencia, producida después de que el sistema sea excitado con electrones. En nuestro caso interesa la luminiscencia que se genera tras la absorción de energía lumínica, o lo que es lo mismo, fotones. A este tipo de luminiscencia se le denomina concretamente fotoluminiscencia, pero como es la forma más estudiada de luminiscencia, se acaba adoptando ese término para denominar este caso concreto. En lo que sigue se hablará solo de luminiscencia refiriéndose a la fotoluminiscencia.

El proceso de fotoluminiscencia no es instantáneo, existe una diferencia temporal entre el momento en el que se produce la excitación y el instante en el que se genera la emisión. Este tiempo característico puede ser de desde unos pocos picosegundos a horas. Por esta razón, la fotoluminiscencia se divide en fluorescencia y fosforescencia. Fluorescencia engloba todos los procesos de fotoluminiscencia cuyo tiempo característico es de entre picosegundos a decenas de milisegundos. Por el contrario, los procesos de fosforescencia tienen tiempos característicos que pueden llegar a horas.

En un proceso lineal de luminiscencia, en el que interviene un sistema con dos niveles de energía (ver **Figura 3.1a**), la intensidad de luz emitida será proporcional a la intensidad de luz absorbida. Por lo que, si la intensidad que incide en el sistema es I_0 y la que pasa a través de él sin ser absorbida es I , la intensidad total emitida vendrá dada por:

$$I_{em} = Q_L (I_0 - I) \quad (3.1)$$

Donde Q_L es la eficiencia de luminiscencia. Las intensidades tienen unidades de fotones por segundo. Q_L representa el cociente entre los fotones absorbidos y los emitidos y toma valores entre 0 y 1. Un valor menor que 1 implica que la energía absorbida se ha perdido en procesos no radiativos (emisión de fonones). Para el caso de un sistema de dos niveles, Q_L coincide con la eficiencia cuántica (*quantum efficiency*, QE , en inglés). QE representa el cociente entre los fotones que se emplean para poblar el nivel electrónico y los que decaen desde ese nivel para dar lugar a emisión radiativa. Para el caso de un sistema de

dos niveles, todos los fotones absorbidos dan lugar a población en el nivel excitado desde el que se genera la emisión, por esta razón, en este caso concreto, QE y Q_L pueden usarse indistintamente.

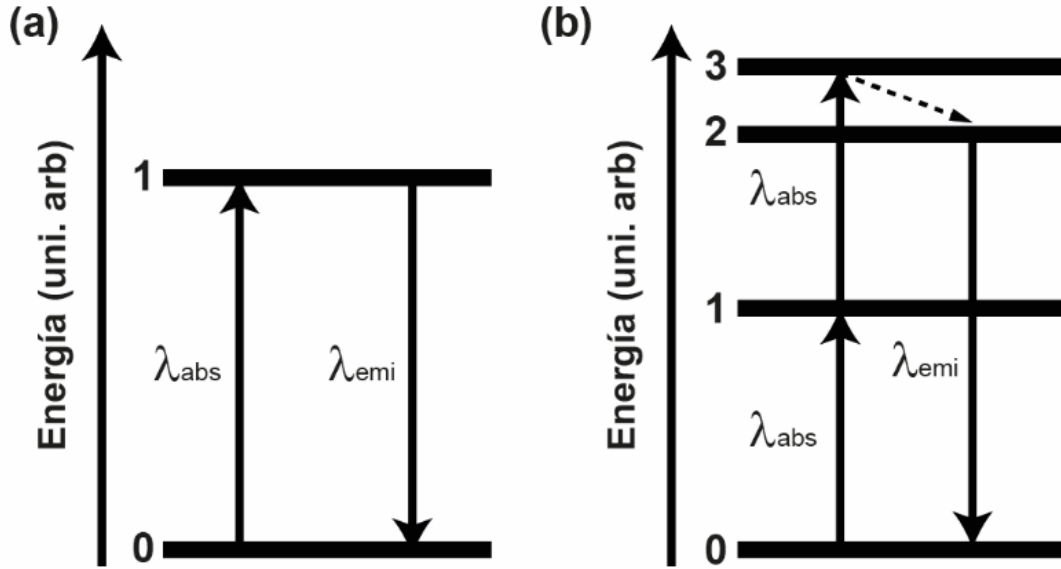


Figura 3.1 Diagramas de niveles. (a) Diagrama de niveles de un ion con sólo dos niveles de energía en el que se muestra un proceso normal de luminiscencia. (b) Diagrama de niveles de un ion con más de dos niveles de energía en el que se muestra un proceso de *upconversion*.

La intensidad de luz que atraviesa el material depende de su coeficiente de absorción (α_{abs}) según la ley de Lambert-Beer:

$$I(x) = I_0 e^{-\alpha_{abs} x} \quad (3.2)$$

Donde x es la extensión de material que atraviesa la radiación incidente. La expresión 3.2 muestra que la luz pierde intensidad de manera exponencial a medida que atraviesa el material. Para la determinación de α_{abs} se emplean espectrofotómetros que miden la cantidad de radiación que atraviesa la muestra. La relación entre la intensidad incidente y la que atraviesa el material viene dada por la densidad óptica (DO):

$$DO = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (3.3)$$

Uniendo las expresiones 3.2 y 3.3, α_{abs} puede relacionarse con la DO medida:

$$\alpha_{abs} = \frac{DO}{d \log e} \quad (3.4)$$

Donde d es el espesor total de la muestra que atraviesa la luz. De esta manera, DO determinará la cantidad de radiación absorbida por la muestra:

$$I_{em} = Q_L I_0 \left(1 - \frac{I}{I_0}\right) = Q_L I_0 (1 - 10^{-DO}) \quad (3.5)$$

En general, no toda la energía emitida puede ser medida. Para tener esto en cuenta, la expresión 3.5 puede modificarse, para el caso de un sistema de densidad óptica baja ($DO < 1$), de la forma:[1]

$$I_{em}^{medida} \cong k_g Q_L I_0 DO \quad (3.6)$$

Donde k_g representa la fracción de fotones emitidos que llegan al detector.

El proceso anterior corresponde a lo que se podría denominar el proceso ‘normal’ de luminiscencia donde radiación de una energía determinada se convierte en radiación de la misma energía o menor. Sin embargo, también se puede obtener emisión a energías mayores que la energía absorbida. Este proceso se conoce como *anti-Stokes* o *upconversion* y solo es posible en sistemas de varios niveles. Para que se produzca este efecto, varios fotones deben ser absorbidos de manera secuencial para que puedan poblarse niveles de más alta energía y así conseguirse emisiones a longitudes de onda más corta que la excitación. Como puede verse en la **Figura 3.1b**, son necesarios dos fotones para alcanzar el nivel excitado 3. Uno es primero absorbido para promover el paso del nivel fundamental al primer excitado (nivel 1) y, después, un segundo fotón se emplea para alcanzar el nivel 3 desde el nivel 1. Posteriormente, el electrón decae de manera no radiativa al estado excitado 2, desde el que decae de nuevo de manera radiativa al nivel fundamental emitiendo un fotón de mayor energía que los fotones absorbidos. A diferencia del proceso normal de luminiscencia, la dependencia de la intensidad emisión con la intensidad de excitación no es lineal. La relación entre ambas vendrá determinada por el número de fotones que intervienen en el proceso de *upconversion*. En el ejemplo de la **Figura 3.1b** tenemos que la intensidad de emisión desde el nivel 2 al fundamental (I_{em}^{20}) es proporcional a la probabilidad de emisión desde el nivel 2 al 0 (A_2), multiplicada por la población en el nivel 2 (N_2):

$$I_{em}^{20} \propto A_2 N_2 \quad (3.7)$$

El nivel 2 se puebla desde el nivel 3 de manera no radiativa por lo que su población vendrá determinada por el número de electrones en el nivel 3 ($N_2 \propto N_3$), que se puebla por absorción de un fotón incidente desde el nivel 1 ($N_3 \propto N_1 I_0$). El nivel 1, a su vez, se puebla desde el nivel fundamental por absorción de un fotón incidente ($N_1 \propto N_0 I_0$). Cuando la potencia de excitación es baja, la población en el nivel fundamental es mucho mayor a la de los estados excitados, por lo que $N_0 \cong N$, donde N es el número total de electrones en el sistema. En conclusión, en este régimen de potencia, la población en el nivel 2 vendrá determinada por la población en el estado fundamental que puede aproximarse por el número total de electrones en el sistema:

$$I_{em}^{20} \propto A_2 N_2 \propto N I_0^2 \quad (3.8)$$

De la expresión anterior se deduce que la emisión radiativa desde el nivel 2 al fundamental no es un proceso lineal con la intensidad de excitación (I_0). La relación entre la intensidad de emisión y la de excitación es cuadrática ya que son necesarios dos procesos secuenciales de absorción. Generalizando este resultado, un proceso de *upconversion* en el que sea necesaria la absorción consecutiva de n fotones para la emisión de un único fotón puede representarse por:

$$I_{em} \propto N I_0^n \quad (3.9)$$

Conociendo la intensidad incidente y midiendo la intensidad de emisión a una longitud de onda determinada, se puede determinar el número de fotones que intervienen en el proceso de *upconversion* que da lugar a esa emisión concreta. Es importante destacar que para la obtención de la expresión 3.8 se ha impuesto un régimen de baja potencia de excitación, por lo que la dependencia de la expresión 3.9 únicamente puede obtenerse cuando la intensidad de excitación es baja. Cuando la intensidad de bombeo aumenta, ya no se puede considerar que la población del nivel fundamental sea mucho mayor que la del resto de niveles. Cuando la potencia de excitación es alta, la mayoría de población se sitúa en el nivel 1, lo que hace que ya no sea necesaria la absorción de un fotón incidente para pasar del nivel fundamental al primer excitado. De esta manera, la emisión desde el nivel 2 únicamente requiere la absorción de un fotón, el que permite poblar el nivel 3 desde el nivel 1.[3] En esta situación, la dependencia con la intensidad de bombeo se vuelve lineal. Cuando se aumenta aún más la intensidad de bombeo, llega un momento en el que el nivel 2 ya no puede aumentar más su población y la emisión pasa a ser independiente de la intensidad de excitación. En este régimen de saturación, aunque se aumente el bombeo, la intensidad de emisión permanece constante o incluso puede decaer.[4]

Como se ha comentado, la expresión 3.9 permite determinar el número de fotones de bombeo necesarios para que se produzca el proceso de *upconversion*. Si se toman logaritmos a ambos lados se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln(I_{em}) \propto n \ln(I_0) \quad (3.10)$$

Se puede ver cómo la dependencia entre los logaritmos de las intensidades de emisión y de bombeo es una recta cuya pendiente representa el número de fotones necesarios para el proceso de *upconversion*. Representado la intensidad asociada a una banda de emisión frente a la intensidad de potencia (W/cm^2) de bombeo (que es proporcional al número de fotones que inciden), se puede obtener el número de fotones necesarios para que se produzca dicha emisión. Esta representación toma el nombre de curva I-P. Más adelante (sección 5.1a) se analizarán las curvas I-P para el proceso de *upconversion* que tiene lugar en una partícula dopada con iones de Er^{3+} e Yb^{3+} .

3.1a- Diagrama de niveles y espectro de emisión.

Como se ha mencionado anteriormente, la emisión de luz se produce por las transiciones radiativas entre niveles energéticos. Los electrones que realizan esas transiciones son los ubicados en la capa de valencia. En el caso de un ion aislado, los niveles energéticos de los electrones de valencia vienen determinados por (i) el campo eléctrico que actúa sobre ellos debido al núcleo y el resto de electrones de las otras capas (apantallamiento), (ii) la interacción de Coulomb entre los electrones de la capa de valencia y (iii) la interacción spin-órbita debida a que el electrón está girando alrededor del núcleo. Estas interacciones hacen que la capa de valencia quede dividida en una serie de niveles electrónicos. Estos niveles electrónicos se nombran empleando los números cuánticos que describen el sistema: n , número cuántico principal; l , número cuántico acimutal; m , número cuántico magnético y s , spin.

La discusión que se presenta a continuación es válida para los iones de tierras raras. Debido a su configuración electrónica, estos iones presentan una serie de características que los diferencian del resto. En la **Figura 3.2** se representan los niveles energéticos correspondientes a un ion de Er^{3+} . [5] Tanto el Er^{3+} como el Yb^{3+} , son iones trivalentes procedentes de los átomos neutros (Er : $[\text{Xe}] 4f^{12} 6s^2$; Yb : $[\text{Xe}] 4f^{14} 6s^2$) a los que les faltan tres electrones. En estos dos casos, las transiciones electrónicas se realizan entre los niveles en los que se divide la capa electrónica $4f^n$ (Er^{3+} : $[\text{Xe}] 4f^{11} 6s^0$; Yb^{3+} : $[\text{Xe}] 4f^{13} 6s^0$). En el caso del ion Er^{3+} , la capa $4f$ consta de 11 electrones (ver **Figura 3.2**). La notación espectroscópica muestra que el suborbital o estado en el que se encuentran los electrones viene determinado por $n = 4$ y $l = 3$. Aparte de la acción del núcleo y los electrones de las otras capas, existe una repulsión electrostática entre los electrones de la capa de valencia. Debido a esta interacción, aparecen una serie de niveles denominados términos que se caracterizan por los posibles valores que pueden tomar los números cuánticos acimutal y de spin totales (L y S). Estos niveles se nombran usando la notación ^{2S+1}L . Finalmente, hay que tener en cuenta que los electrones están girando alrededor del núcleo. Esto hace que aparezca un campo magnético que interactúa con el momento magnético del electrón a través de su spin. En este caso, hay que introducir un nuevo número cuántico para que el sistema quede bien representado: el momento angular, $J = L + S$. Cada uno de los términos se divide en $2J+1$ estados llamados multipletes que corresponden con los niveles energéticos del ion (**Figura 3.2**). Estos niveles se nombran siguiendo la notación $^{2S+1}L_J$.

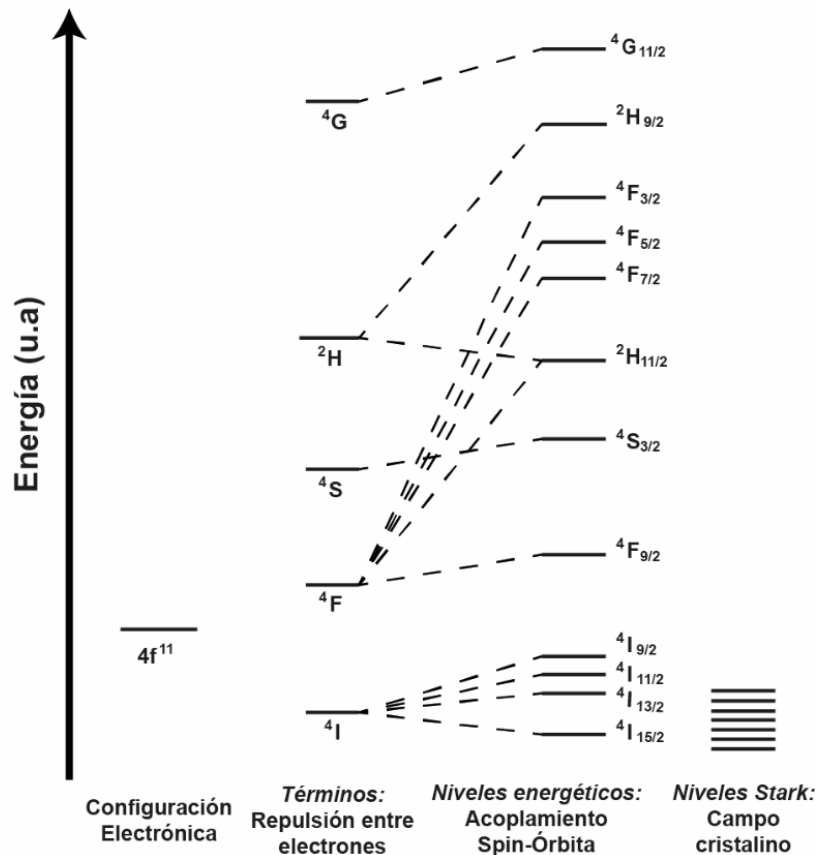


Figura 3.2 Diagrama de niveles de un ion de Er^{3+} . Se muestran los distintos niveles en los que se divide la capa de valencia debido a las distintas perturbaciones.

Por otro lado se puede ver, en la parte derecha de la **Figura 3.2**, que existe un desdoblamiento adicional de los niveles energéticos. Este desdoblamiento se produce cuando el ion es introducido dentro de una matriz cristalina, i.e., se rodea de otros iones con los que interacciona. El conjunto formado por el ion dopante (central) y los contiguos (ligandos) se denomina centro ópticamente activo. Por acción del campo cristalino (generado por los ligandos), los niveles electrónicos del ion central se desdoblan en diferentes subniveles debido al efecto Stark. Este efecto describe el desplazamiento en energías y el desdoblamiento de las líneas espectrales debido a la presencia de un campo eléctrico externo estático (campo cristalino). El número y anchura de los niveles Stark depende tanto de la simetría como de la intensidad del campo cristalino local que afecta al ion.[6] En el caso de los iones trivalentes de tierras raras (i.e. Er^{3+} e Yb^{3+}), los electrones de la capa de valencia están protegidos por los electrones que ocupan las capas 5s y 5p, haciendo que el efecto de los iones de la matriz cristalina sobre ellos sea débil. En este caso, la interacción spin-órbita domina sobre el efecto del campo cristalino. Aunque este último produce un desplazamiento en energías de los niveles y su desdoblamiento, el efecto de la interacción spin-orbita es mayor, lo que hace que el espectro de emisión de los iones en el cristal sea similar al de los iones aislados. Además, esto también produce que no haya grandes diferencias entre espectros de emisión de iones trivalentes de tierras raras en diferentes matrices y las propiedades que presentan pueden, normalmente, extrapolarse de una matriz a otra. En la **Figura 3.3** se representan dos espectros de emisión de partículas dopadas con iones de Er^{3+} , pero con distinta matriz cristalina. Se puede ver como aparecen las mismas líneas de emisión en torno a 530 nm ($^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$), 550 nm ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) y 660 nm ($^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$), pero con distinta forma espectral.

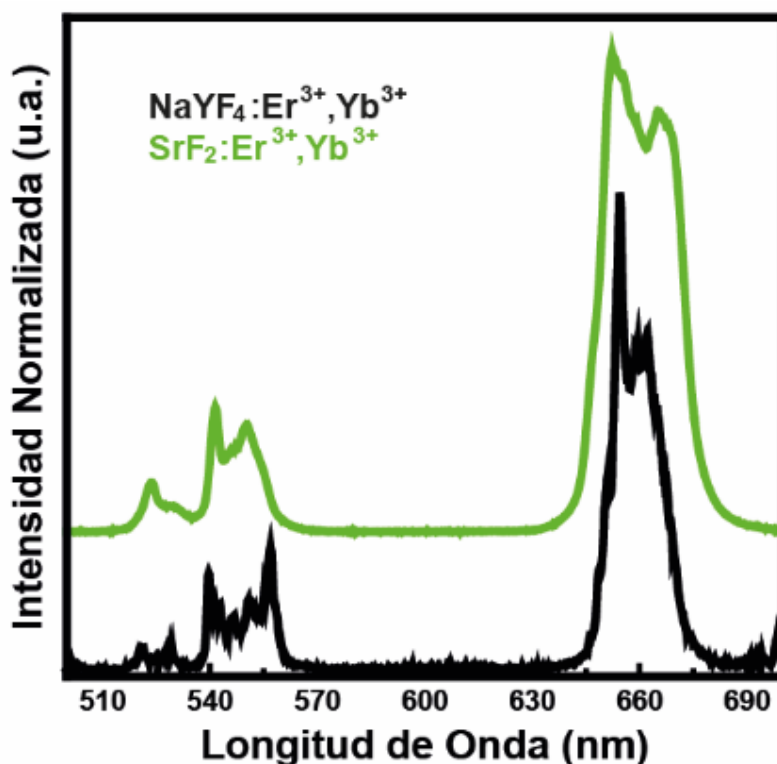


Figura 3.3 Espectros de emisión de iones de Er^{3+} en distinta matriz. Espectro de emisión bajo excitación a 980 nm de iones de Er^{3+} dopados en una matriz de fluoruro de sodio ytrio (negro) y en una matriz de fluoruro de estroncio (verde).

La diferencia en la forma de las bandas de emisión se debe a la acción de campos cristalinos distintos. La degeneración final de los niveles electrónicos y las probabilidades de transición vienen determinadas por la simetría local del cristal en el lugar donde queda colocado el ion (simetría del centro ópticamente activo). Estos dos efectos hacen que el espectro se module y sea ligeramente distinto dependiendo de la matriz cristalina.

En 1968, Dieke y colaboradores publicaron el diagrama de niveles para los iones trivalentes de tierras raras en un cristal de cloruro de lantano (LaCl_3).[7] Este diagrama, conocido como Diagrama de Dieke, se emplea como base para la identificación de los niveles energéticos de los iones lantánidos introducidos en cualquier matriz.

3.1b- Probabilidades de absorción y emisión.

La forma del espectro, tanto de emisión como de absorción, viene determinada por las probabilidades de transición. La probabilidad de transición P_{if} entre un estado inicial i de menor energía y un estado final f de mayor energía es proporcional al elemento de matriz $|\langle\psi_f|H|\psi_i\rangle|^2$, donde ψ representa las autofunciones del estado inicial y final y H es el Hamiltoniano que describe el sistema. Para una transición dipolar eléctrica, el Hamiltoniano de la interacción toma la forma $H = \mathbf{u}_e \cdot \mathbf{E}$, donde \mathbf{u}_e es el momento dipolar eléctrico y \mathbf{E} el campo eléctrico incidente. Tomando la aproximación de que la longitud de onda del campo incidente es mucho mayor que el tamaño del centro óptico y haciendo el promedio de todas las posibles orientaciones entre los vectores de los dipolos eléctricos de ambos estados y el vector del campo incidente, la probabilidad de absorción queda:[1]

$$P_{if} = \frac{\pi}{3n_m\epsilon_0 c_0 \hbar^2} I |\boldsymbol{\mu}_{if}|^2 g(\omega) \quad (3.11)$$

Donde c_0 es la velocidad de la luz en el vacío, $I = \frac{1}{2} n_m c_0 \epsilon_0 E_0^2$ la intensidad de la radiación incidente con E_0 la magnitud del campo, $g(\omega)$ la forma de línea y $|\boldsymbol{\mu}_{if}|$ el módulo del elemento de matriz del momento dipolar eléctrico:

$$|\boldsymbol{\mu}_{if}| = |\langle\psi_f|\mathbf{er}|\psi_i\rangle| \quad (3.12)$$

Se puede ver como la probabilidad de absorción depende tanto de la intensidad de la luz incidente y como de μ_{if} . El análisis es análogo para el caso de una transición dipolar magnética donde el Hamiltoniano de la interacción es $H = \mathbf{u}_m \cdot \mathbf{B}$, con \mathbf{u}_m el momento dipolar magnético y \mathbf{B} el campo magnético incidente. El elemento de matriz del momento dipolar magnético es:

$$|\boldsymbol{\mu}_{if}| = \left| \langle\psi_f| \frac{e}{2m} (\mathbf{L} + 2\mathbf{S}) |\psi_i\rangle \right| \quad (3.13)$$

En el caso anterior se ha tratado el paso de un nivel de menor energía a uno de mayor energía por absorción de radiación incidente. Se puede realizar el mismo análisis pero para el caso de la emisión espontánea en la que un electrón pasa de un estado de mayor energía a uno de menor emitiendo radiación. En este caso, la probabilidad de transición dipolar eléctrica viene dada por:

$$A = \frac{n_m \omega_0^3}{3\pi\epsilon_0 c_0^3 \hbar} I |\mu_{if}|^2 \quad (3.14)$$

Donde ω_0 es la frecuencia de la transición en el vacío. Se puede ver que en este caso la probabilidad de transición también viene determinada por μ_{if} . Además, la probabilidad depende de la diferencia de energía entre los dos niveles involucrados (a través de ω_0), de tal manera que la probabilidad será mayor cuanto más separados en energía estén los niveles. Cuando la separación en energía es pequeña, esta probabilidad disminuye al mismo tiempo que la probabilidad de transición no radiativa aumenta.

La probabilidad de emisión no radiativa es inversamente proporcional a la exponencial de la separación de energía entre los niveles (ΔE):

$$A_{nr} = cte_1 e^{-cte_2 \Delta E} \quad (3.15)$$

Donde cte_1 y cte_2 son constantes. De esta manera, cuanto menor sea la separación energética entre niveles, mayor será la probabilidad de emisión no radiativa. Como se ha comentado anteriormente, las emisiones no radiativas implican la emisión de fonones. Existe un número máximo de fonones que determina si la transición radiativa es más probable o no que la no radiativa. Cuando el número de fonones involucrados es menor que el máximo (5 o 6 dependiendo del material), la probabilidad de emisión no radiativa supera a la radiativa.[8] Por esta razón, cuanto mayor sea el número de fonones necesario, o lo que es lo mismo, cuanto mayor sea la diferencia de energía entre los niveles, mayor será la probabilidad de emisión radiativa frente a la no radiativa.

Como se ha visto, la probabilidad de transición depende del elemento de matriz μ_{if} , por lo que una transición estará permitida (probabilidad distinta de cero) siempre y cuando $\mu_{if} \neq 0$. Para el caso de transiciones dipolares eléctricas (expresión 3.12), el operador r tiene paridad impar, lo que significa que siempre que las funciones de onda ψ_f y ψ_i tengan paridades iguales, el elemento de matriz μ_{if} será nulo. Esto hace que únicamente transiciones entre estados con distinta paridad estén permitidas. La paridad viene determinada por el número cuántico orbital l según la regla de selección de Laporte: $(-1)^l$. Para el caso de transiciones dipolares magnéticas, el momento dipolar magnético es una función de paridad par (expresión 3.13), por lo que el elemento de matriz será siempre nulo cuando las funciones de onda ψ_f y ψ_i tengan distinta paridad. Esto hace que, aunque una transición entre niveles esté prohibida por el proceso dipolar eléctrico, puede darse a través de una transición dipolar magnética. A esta regla de selección basada en la paridad se le pueden añadir otras debidas a las interacciones anteriormente descritas (repulsión de Coulomb entre electrones e interacción spin-órbita). En el caso de las transiciones dipolares eléctricas, las transiciones entre términos (ver **Figura 3.2**) solo son posibles cuando $\Delta S = 0$ y $\Delta L \neq 0$ (pero no $0 \rightarrow 0$), mientras que las transiciones entre niveles energéticos vienen determinadas por el momento angular total J , de tal manera que son permitidas las transiciones que cumplan $\Delta J = \pm 1, 0$ (pero no $0 \rightarrow 0$). Según estas reglas de selección, la transición entre niveles electrónicos ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, (donde $J_i = 9/2$, $J_f = 15/2$, por lo que $\Delta J = 3$) es una transición prohibida. Sin embargo, esta transición corresponde con una banda de emisión centrada en torno 660 nm que, como puede verse en la **Figura 3.3**, se produce. Estas transiciones reciben el nombre de transiciones dipolares forzadas y tienen lugar porque, cuando el ion es introducido dentro de una

matriz, las reglas de selección se relajan y transiciones *a priori* prohibidas poseen probabilidad no nula. Las funciones de onda correspondientes al ion aislado ya no son válidas, hay que sustituirlas por las correspondientes en el caso del ion afectado por el campo cristalino, y l deja de ser un buen número cuántico. Por esta razón, las reglas de selección determinadas por l se ven afectadas, como la regla de selección de Laporte. Esta relajación hace que sean posibles las transiciones dipolares eléctricas en iones trivalentes de tierras raras, de otra manera prohibidas, ya que se realizan dentro de la misma capa electrónica (4f), luego constan de la misma paridad ($l = 3$).

Finalmente, es importante mencionar que, debido a que el sistema es asimétrico, el Hamiltoniano que lo representa también lo será, por lo que el valor de los elementos de matriz dependerá de la simetría y orientación de los estados respecto al campo cristalino. Esto da lugar a estados de polarización que se reflejan en distintos espectros de emisión y absorción dependiendo de la dirección de propagación y la polarización de la luz dentro del cristal.

La evaluación de las transiciones electrónicas en un centro ópticamente activo es un problema muy complejo. Para poder afrontarlo se emplea la teoría de grupos. De una manera muy simplificada, ésta establece, cómo se ha comentado anteriormente, que las probabilidades de transición vendrán determinadas por las simetrías del centro óptico (*i.e.* la colocación espacial de los iones). Dependiendo de la estructura de la matriz cristalina, el centro óptico tendrá una simetría u otra. Ésta está íntimamente relacionada con las probabilidades de transición de las posibles polarizaciones. Esto hace que, como se verá en la sección 3.3, tanto el espectro de absorción como el de emisión dependan de la dirección de propagación y la polarización de la luz dentro del cristal. De manera inversa, como la emisión polarizada depende de la geometría, se pueden estudiar las simetrías de los centros ópticos analizando el espectro de emisión polarizado.[9]

3.1c- Procesos de transferencia de energía.

La discusión anterior se ha centrado en un único ion que absorbe la radiación incidente y en consecuencia genera emisión radiativa. Sin embargo, iones próximos pueden transferirse energía unos a otros. Existen diferentes mecanismos de transferencia de energía entre niveles electrónicos (de un mismo ion o de varios) que intervienen en el proceso de *upconversion*. [10, 11] Pueden ser tanto radiativos como no radiativos e involucrar o no la emisión de fonones.[12] Además, los procesos pueden actuar secuencialmente o al mismo tiempo. A continuación se describen los mecanismos de transferencia de energía que pueden intervenir en un proceso de *upconversion*. Se han indicado sus nombres en inglés por los que son comúnmente conocidos.

Relajación cruzada (cross-relaxation, CR).

El proceso de relajación cruzada (CR) es un mecanismo de transferencia de energía no radiativo en el que se alcanzan niveles excitados pero de menor energía que el que se despuebla. Puede darse tanto en un único ion como entre dos vecinos. Como puede verse en la **Figura 3.4a**, el nivel 4 se despuebla para poblar el nivel 3. Si la CR involucra más de un ion, el proceso será más probable cuanto menor sea la distancia entre ellos. Por esta razón, la probabilidad de que este proceso tenga lugar aumenta con la concentración.

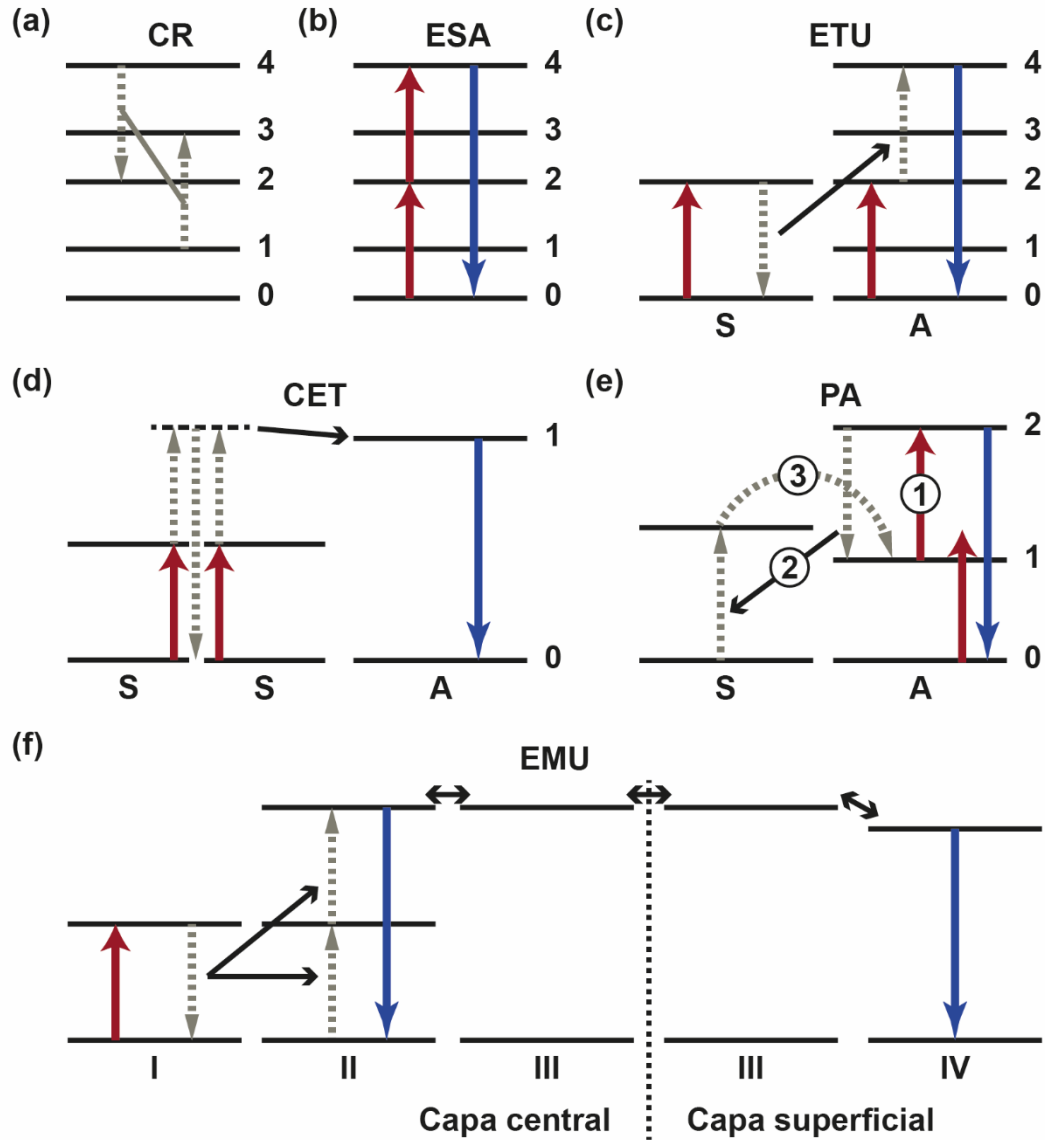


Figura 3.4 Diagramas de los distintos procesos de transferencia de energía. (a) Relajación cruzada (CR). (b) Absorción en el estado excitado (ESA). (c) Excitación por transferencia secuencial de energía (ETU). (d) Transferencia cooperativa de energía (CET). (e) Avalancha de fotones (PA). (f) Upconversion mediada por migración de energía (EMU).

Absorción en el estado excitado (excited state absorption, ESA).

El mecanismo más simple para poblar niveles excitados de mayor energía que la de excitación es la absorción secuencial de varios fotones incidentes, de tal manera que se produce la absorción de radiación incidente por un estado excitado (ESA). En este proceso interviene un único ion con múltiples niveles electrónicos. En la **Figura 3.4b** se puede ver un ejemplo en el que un único ion absorbe secuencialmente dos fotones para alcanzar un nivel excitado superior desde el que decae de manera radiativa generando emisión de mayor energía que la radiación incidente. Para que tenga lugar este proceso, los niveles intermedios, desde donde se absorben los sucesivos fotones, deben ser estables y poseer la población electrónica adecuada. Este proceso se ve favorecido cuando la vida

media de los niveles intermedios es alta ya que la absorción del siguiente fotón incidente debe ocurrir antes de que el nivel se desexcite. También se ve favorecido si la diferencia en energía entre el nivel intermedio y el fundamental es próxima a la diferencia con el estado final de mayor energía. De esta manera se asegura que el nivel excitado, desde donde se produce el proceso de ESA, pueda ser poblado por una transición desde el nivel fundamental mediante la absorción de un fotón incidente.

Excitación por transferencia secuencial de energía (energy transfer upconversion, ETU).

Este proceso es semejante al de ESA, pero en este caso están involucrados dos iones. El primero es el que absorbe la radiación incidente (*sensitizer, S*, en inglés), mientras que el segundo es que emite la radiación de mayor energía que la excitación (*activator, A*, en inglés). Este proceso es mucho más eficiente que el mecanismo de ESA y constituye un ejemplo de cómo un proceso de transferencia de energía entre iones distintos puede beneficiar el proceso de *upconversion*.

El proceso está resumido en la **Figura 3.4c**. En primer lugar, el ion S absorbe un fotón procedente de la excitación pasando al estado excitado. Posteriormente, se desexcita de manera no radiativa cediendo la energía al ion contiguo A que, estando ya en un estado excitado, pasa a un estado de mayor energía. La energía se transfiere gracias a la interacción resonante entre dipolos (*dipole-dipole resonant interaction*). Finalmente, A se desexcita de manera radiativa generando emisión de mayor energía que la excitación. En el ejemplo de la **Figura 3.4** se describe un proceso de *upconversion* a dos fotones en el que A se encuentra ya en un estado excitado gracias a la absorción de un fotón procedente de la excitación, sin embargo, varios procesos de ETU encadenados pueden dar lugar a la absorción de más de un fotón por parte del ion emisor, si la transferencia entre A y S es más eficiente que la absorción de la excitación por parte de A.

Transferencia cooperativa de energía (cooperative energy transfer, CET).

Este proceso es análogo al proceso de ETU, pero en este caso no intervienen niveles de energía reales. En un proceso típico (ver **Figura 3.4d**), dos iones S son activados de manera cooperativa a un nivel excitado virtual cuya energía es la suma de la de dos fotones incidentes. Entonces, la energía de estos dos iones se transfiere de manera simultánea al ion A, el cual se desexcita generando la emisión de *upconversion*. [11] También puede ocurrir que se emita directamente la radiación desde ese estado virtual sin necesidad de que se transfiera la energía. El proceso de CET es mucho menos eficiente que el de ETU ya que intervienen niveles virtuales y no reales.

Avalancha de fotones (photon avalanche, PA).

Este fenómeno está representado en la **Figura 3.4e**. Requiere la intervención de un proceso de ESA y una CR. A diferencia de los casos anteriores, la separación energética entre el nivel fundamental y el nivel intermedio (nivel 1) no corresponde con la energía de excitación, pero sí la diferencia entre los estados 2 y 1. Por esta razón, el nivel 1 debe haber sido poblado por otro proceso alternativo. Desde el nivel 2 del ion A se produce la emisión radiativa.

El proceso completo es cíclico. En primer lugar, el ion A pasa del estado excitado 1 al 2 por un proceso de ESA al absorberse un fotón incidente. En esta situación, se produce una CR entre los iones que hace que el ion A se desexcite desde el nivel 2 al 1 promoviendo la excitación del ion S desde su nivel fundamental al excitado. Posteriormente, el ion S transfiere su energía al ion A para que se pueble el estado excitado 1, cerrándose el ciclo.[13] El balance del proceso es que un ion A en el estado excitado 1 genera dos iones en ese mismo estado. Cuando el proceso continúa, el efecto se ve multiplicado por dos cada vez que se produce. De esta manera, n ciclos dan lugar a 2^n iones en el estado excitado 1.

Para potencias inferiores a un cierto umbral, la emisión de *upconversion* es muy débil debido a que el estado intermedio tiene una población baja y el proceso de ESA no es muy eficiente. Al cabo de un cierto tiempo (segundos) el nivel 1 aumenta su población gracias al proceso cíclico descrito. Cuando la potencia aumenta, el número de electrones que son excitados al estado 2 por un proceso de ESA aumenta, por lo que la emisión de *upconversion* también lo hace. En esta situación, la dependencia de la emisión con la intensidad de bombeo aumenta de manera que la curva I-P tiene una pendiente mucho más alta que la que tendría el proceso normal de *upconversion*. [14].

Upconversion mediada por migración de energía (energy migration-mediated upconversion, EMU).

Para que se produzca este proceso son necesarios, típicamente, 4 iones distintos dentro de una misma matriz, colocados en dos capas separadas y con unas concentraciones determinadas (ver **Figura 3.4f**). [15] La zona central contiene iones de tres tipos (I, II y III), mientras que la capa exterior consta de iones de solo dos tipos (III y IV). El proceso comienza en la zona central. En primer lugar, dos iones de distinto tipo intervienen en un proceso de ETU por el cual se puebla el estado excitado del segundo ion. Después, esta energía se transmite de manera no radiativa al tercer tipo de ion (III). Posteriormente la energía migra entre iones del tercer tipo hasta alcanzar la capa exterior. Una vez allí, la energía se transmite al último tipo de ion (IV) desde el cual se genera la emisión radiativa. El ion de tipo II también genera emisión desde el estado excitado.

De todos los procesos de *upconversion* descritos, ETU está considerado como el más eficiente. Diferentes autores han realizado a lo largo los años un gran esfuerzo para determinar experimentalmente la eficiencia de los diferentes mecanismos de *upconversion*. Entre todos ellos destaca François A. Auzel, quien fue el primero en probar el fenómeno propuesto por N. Bloembergen en 1959. [12, 16, 17] La Q_L medida para el proceso de ETU es 10^{-3} , mientras que para los procesos de ESA y CET es 10^{-5} y 10^{-6} , respectivamente. Se puede ver como la eficiencia del proceso de ETU es dos o tres órdenes de magnitud mayor que ESA y CET, haciendo que el primer proceso sea el dominante a la hora de generar luz de mayor energía que la radiación incidente.

3.1d- Proceso de *upconversion* en sistemas $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ con excitación a 980 nm.

Una vez conocidos los mecanismos de *upconversion* y los procesos de transferencia de energía que pueden dar lugar a él, se puede analizar el caso concreto de un sistema

compuesto por iones Er^{3+} e Yb^{3+} . La **Figura 3.5** muestra un espectro de emisión de un sistema $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ obtenido tras ser excitado con radiación a 980 nm a una intensidad de potencia de 45 MW/cm². Las principales emisiones en la región visible que pueden observarse son verde (dos bandas centradas en torno a 525 y 550 nm), rojo (una única banda centrada en 660 nm) y morado (emisión en torno a 410 nm). También pueden observarse una emisión en torno a 800 nm y, en este caso concreto, bandas de emisión en torno a 470 nm, 505 nm, 615 nm, 694 nm y 760 nm.

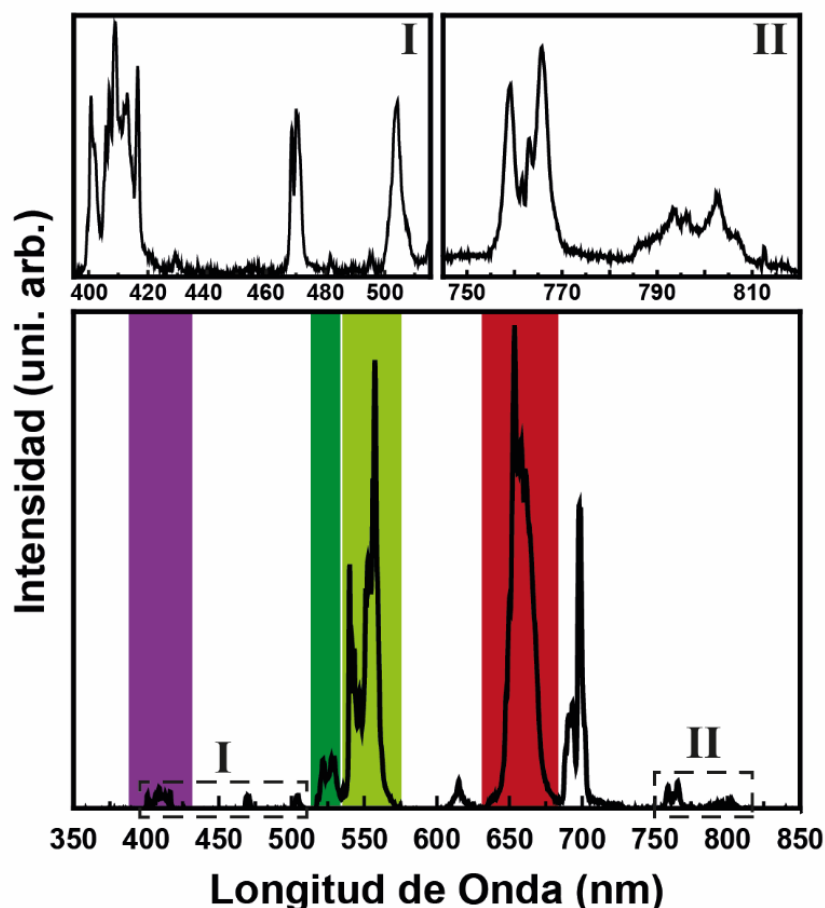


Figura 3.5 Espectro de emisión de un sistema $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ al ser excitado con radiación de 980 nm. Se pueden distinguir claramente las tres bandas de emisión en el visible (morado, verde y rojo), al igual que bandas en el infrarrojo cercano.

Existe una gran disparidad en los mecanismos de *upconversion* propuestos por distintos autores para diferentes sistemas $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ en múltiples matrices. Las diferencias fundamentales radican en los caminos que se siguen para poblar los distintos niveles y en cuáles de ellos están involucrados en las distintas emisiones observadas. Existen dos modelos generales propuestos en la literatura que describen el proceso de *upconversion* para sistemas $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$. El primero de ellos es el mecanismo genérico ampliamente aceptado, pero existe un mecanismo alternativo propuesto únicamente para la matriz de fluoruro de sodio ytrio (NaYF_4). [18] Se van a discutir ambos mecanismos ya que la mayoría de las partículas empleadas a lo largo de esta tesis están compuestas por esa matriz particular.

Modelo genérico.

Un ion Yb^{3+} absorbe la radiación infrarroja produciéndose la transición $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$. La energía absorbida es donada de manera resonante a un ion Er^{3+} adyacente de tal manera que el ion es excitado al estado $^4\text{I}_{11/2}$ ($^4\text{I}_{15/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$) (ver **Figura 3.6**). Esta transferencia de energía es muy eficiente debido a que las energías de los niveles $^2\text{F}_{5/2}$ del Yb^{3+} y $^4\text{I}_{11/2}$ del Er^{3+} son muy próximas (resonantes). Una vez en el estado excitado, el ion Er^{3+} puede pasar a niveles superiores de energía gracias a una transferencia de energía similar a la anterior a través de un proceso de ETU que puede tener lugar por dos rutas alternativas:

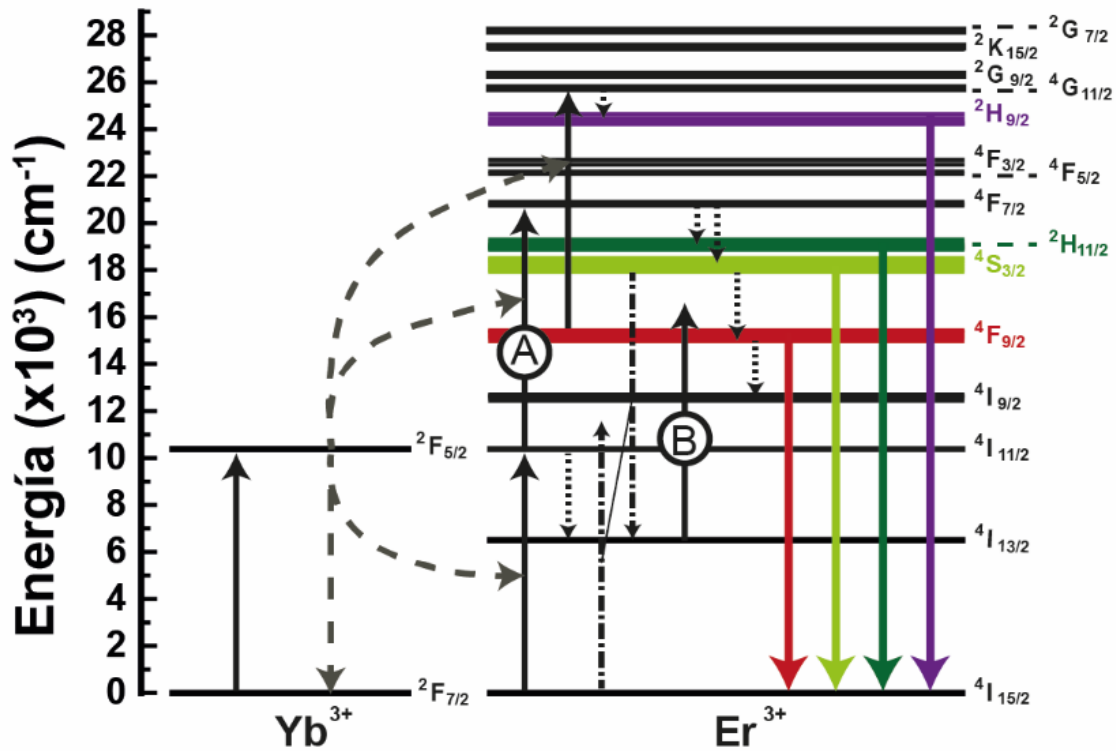


Figura 3.6 Diagrama de niveles y transferencia de energía entre niveles para el modelo genérico de *upconversion* para un sistema $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$. Se indican los dos distintos procesos (A y B) que dan lugar a la población del nivel $^4\text{F}_{9/2}$. Las flechas sólidas ascendentes indican las transiciones que se producen por absorción de energía procedente de la excitación gracias a un proceso de ETU. Las flechas grises indican transferencia de energía entre los iones Yb^{3+} y Er^{3+} . Las flechas punteadas descendentes indican emisiones no radiativas, mientras que las flechas descendentes sólidas indican emisiones radiativas. Las flechas unidas entre sí y formadas por puntos y rayas indican procesos de CR.

- Ruta A: se produce en primer lugar la transición $^4\text{I}_{11/2} \rightarrow ^4\text{F}_{7/2}$. Una vez en el nivel $^4\text{F}_{7/2}$, el sistema puede desexcitarse al fundamental mediante la transición $^4\text{F}_{7/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ que da lugar a una banda de emisión en torno a 490 nm. Esta banda no suele ser muy intensa (como puede comprobarse en la **Figura 3.5**) porque la emisión desde el nivel $^4\text{F}_{7/2}$ es fundamentalmente no radiativa haciendo que se pueblen los niveles $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$. Desde este último se puebla el nivel $^4\text{F}_{9/2}$ de manera también no radiativa. Estas transiciones son fundamentalmente no radiativas porque la separación energética entre los niveles es del

orden de cientos de cm^{-1} y la probabilidad de transferencia de energía a la red asistida por fonones es alta.

- *Ruta B*: en este caso, se produce la transición $^4\text{I}_{13/2} \rightarrow ^4\text{F}_{9/2}$, previa desexcitación desde el nivel $^4\text{I}_{11/2}$ al $^4\text{I}_{13/2}$ o por una CR entre iones Er^{3+} ($^4\text{I}_{15/2} + ^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2} + ^4\text{I}_{13/2}$).

Las rutas A y B implican la absorción de la energía de 2 fotones por parte del ion Er^{3+} , lo que da lugar a un proceso cuadrático por el que se han poblado los niveles, $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$ y $^4\text{F}_{9/2}$. Desde estos niveles el ion puede desexcitarse al nivel fundamental de manera radiativa generando, como ya se ha dicho, dos bandas de emisión verde centradas en torno a 525 nm ($^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) y 550 nm ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) y una banda de emisión roja centrada en torno a 660 nm ($^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$). También puede obtenerse emisión en torno a 790-800 nm ($^4\text{I}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$), previa desexcitación desde el nivel $^4\text{F}_{9/2}$. Por último tienen lugar transiciones entre niveles excitados como es la emisión en torno a 760 nm ($^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{13/2}$).

Como se ha dicho, existen dos caminos por los que el nivel $^4\text{F}_{9/2}$ puede poblarse. A través de la ruta A, los niveles que dan lugar a la emisión en el verde también se pueblan, mientras que la ruta B únicamente da lugar a emisión en el rojo. Existen estudios que muestran que el segundo camino es más probable que el primero, ya que existe un desacople entre las emisiones roja y verde.[3, 19]

El modelo estándar también establece que pueden poblarse niveles más altos de energía desde el nivel $^4\text{F}_{9/2}$ por absorción de un tercer fotón incidente. Puede producirse un proceso de ETU por el cual los niveles $^2\text{G}_{9/2}$ y $^4\text{G}_{11/2}$, muy próximos en energía, se pueblan desde el nivel $^4\text{F}_{9/2}$. En el esquema de niveles de la **Figura 3.6**, el bombeo solo puebla el nivel $^4\text{G}_{11/2}$, por lo que la población del nivel $^2\text{G}_{9/2}$ es debida al acoplamiento térmico entre esos dos niveles.[20] Desde $^4\text{G}_{11/2}$, el ion puede desexcitarse de manera no radiativa al inmediatamente inferior ($^2\text{H}_{9/2}$), desde el que se genera emisión morada en torno a 410 nm ($^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) y otra banda centrada en torno a 694 nm ($^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$).

El modelo estándar determina que las emisiones roja y verde son producto de un proceso a dos fotones, mientras que la emisión morada requiere la absorción de tres fotones para producirse. Sin embargo, Dong y colaboradores observaron que nanopartículas de $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ pueden producir emisiones en el verde (550 nm) y el rojo a través de un proceso a tres fotones.[11] Explicaron esta anomalía en el modelo genérico mediante procesos de CR que hacen que los niveles $^4\text{S}_{3/2}$ y $^4\text{F}_{9/2}$ se pueblen gracias a la absorción secuencial de tres fotones. Este proceso también fue observado en una ocasión en el desarrollo de esta tesis al excitar partículas micrométricas formadas por esa matriz y dopantes empleando potencias en el intervalo de 7 a 600 KW/ cm^2 . Estos resultados no se han incluido ya que no pudieron reproducirse. Este fenómeno no forma parte del proceso normal de *upconversion* y solamente es visible en determinadas condiciones experimentales que no se pudieron repetir.

Modelo específico alternativo para la matriz $\beta\text{-NaYF}_4$.

En 2014, Anderson y colaboradores descubrieron que el modelo estándar ampliamente aceptado no puede aplicarse al caso concreto de iones de Er^{3+} e Yb^{3+} dentro de una matriz de NaYF_4 en fase β . [18] Recientemente, Cho y colaboradores realizaron un estudio en el que corroboraban este hallazgo.[19] En los sistemas $\text{NaYF}_4\text{:Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$, la eficiencia de emisión de las bandas verde y roja (intensidad total emitida) es semejante, lo que

proporciona un valor de cociente de intensidades (verde entre rojo) de esas bandas en torno a 0.4. Este valor del cociente de intensidades no se explica de manera adecuada con los mecanismos incluidos en el modelo genérico. Según este último, a altas potencias, la ruta A se ve favorecida frente a la B ya que los electrones en el nivel $^4I_{11/2}$ tendrán una probabilidad mayor de ser excitados al $^4F_{7/2}$ por un proceso de ETU que de decaer al nivel $^4I_{13/2}$. Esto implica un descenso de la emisión roja frente a la verde, lo que da lugar a un cociente de intensidades mayor que 1 y no 0.4, como se observa experimentalmente.[3]

Por otro lado, en los sistemas $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$, la banda de emisión en el morado tiene una eficiencia de emisión importante a bajas intensidades de potencia (20 W/cm^2) que tampoco se explica asumiendo los mecanismos propuestos en el modelo genérico.

El nuevo modelo propuesto por Anderson y colaboradores está recogido en la **Figura 3.7** y para su desarrollo se basaron en partículas micrométricas de $\beta\text{-NaYF}_4\text{:2\%Er}^{3+},18\%\text{Yb}^{3+}$. Las principales diferencias con el modelo estándar son las siguientes:

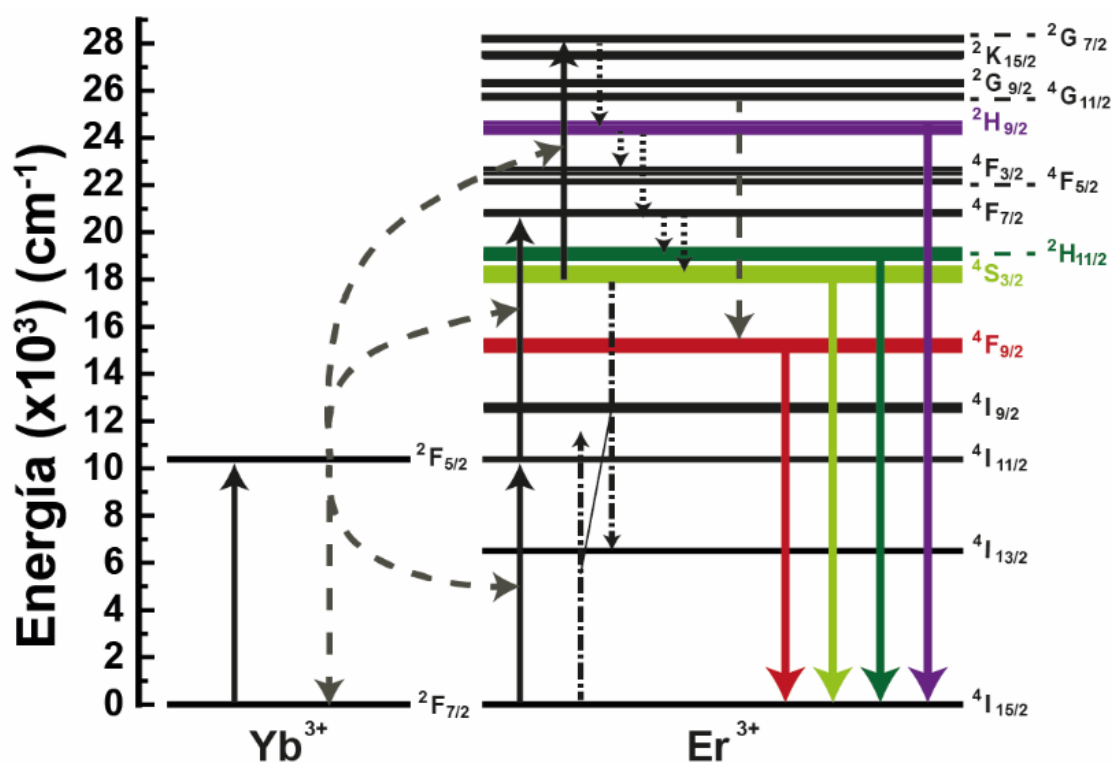


Figura 3.7 Diagrama de niveles y transferencia de energía entre niveles para el modelo específico de *upconversion* para sistemas $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$. Las flechas sólidas ascendentes indican las transiciones que se producen por absorción de energía procedente de la excitación gracias a un proceso de ETU. Las flechas grises indican transferencia de energía entre los iones Yb^{3+} y Er^{3+} . Las flechas punteadas descendentes indican emisiones no radiativas, mientras que las flechas descendentes sólidas indican emisiones radiativas. Las flechas unidas entre sí y formadas por puntos y rayas indican procesos de CR.

1- Mecanismo por el que se puebla el nivel $^2H_{9/2}$: Como se puede ver en la **Figura 3.7**, Anderson y colaboradores proponen que el nivel $^2H_{9/2}$ se puebla a través de emisiones no radiativas desde los niveles $^4G_{11/2}$ y $^2K_{15/2}$. Estos niveles, a su vez, se pueblan por un

proceso de ETU desde el nivel $^4S_{3/2}$. Este resultado lo obtuvieron al analizar la dependencia de la emisión morada con el tiempo. Vieron que la curva de decaimiento desde el nivel $^2H_{9/2}$ es muy próxima a la que se obtiene al multiplicar las asociadas a la emisión desde los niveles $^4S_{3/2}$ y $^4I_{11/2}$. Concluyeron así que la emisión morada es generada a través de un proceso de ETU en el que el nivel $^2H_{9/2}$ se puebla desde el nivel $^4S_{3/2}$.

2- Mecanismo por el que se puebla el nivel $^4F_{9/2}$: De las curvas de emisión con el tiempo excitando a los niveles $^4G_{11/2}$ y $^2K_{15/2}$ (en torno a 380 nm), obtuvieron que el tiempo de llenado de los niveles $^2H_{9/2}$ y $^4F_{9/2}$ es similar, pero superior al del nivel $^4S_{3/2}$. Este último coincide con el tiempo de decaimiento de la emisión azul. De estos datos concluyeron que el nivel $^4F_{9/2}$ se puebla desde los niveles $^4G_{11/2}$ y $^2K_{15/2}$ y no a través de los caminos A y B descritos en el modelo genérico. El mecanismo que proponen por el que se puebla $^4F_{9/2}$ es la transferencia de energía de nuevo al ion Yb^{3+} desde el nivel $^4G_{11/2}$, descartando una CR entre iones Er^{3+} ya que comprobaron que el cociente entre las intensidades verde y roja no depende de la concentración de Er^{3+} . Este nuevo camino por el que se puebla el nivel $^4F_{9/2}$ hace que la emisión roja sea producto de un proceso a tres fotones, en contraposición al modelo estándar en el que la emisión solo requiere la absorción de dos.

Con las dos nuevas transiciones propuestas (un proceso de ETU entre $^4S_{3/2}$ y los niveles $^4G_{11/2}$ y $^2K_{15/2}$ y la transferencia de energía del ion Er^{3+} al Yb^{3+} que da lugar a la relajación del nivel $^4G_{11/2}$ al $^4F_{9/2}$) los autores fueron capaces de explicar tanto las curvas I-P como las curvas de decaimiento de la emisión con el tiempo y las Q_L medidas para diferentes partículas de $\beta-NaYF_4:Er^{3+},Yb^{3+}$.

Cho y colaboradores obtuvieron un resultado semejante al estudiar la dependencia de la emisión con el tiempo y la potencia de micropartículas de $\beta-NaYF_4$ dopadas con un 3% de iones Er^{3+} y un 20% de Yb^{3+} . [19] Estos autores afirman que existe una probabilidad alta de que se produzcan CRs asistidas por fonones entre iones de Er e Yb debido a que las vibraciones de la red de la matriz de $\beta-NaYF_4$ tienen una energía del orden de 300-400 cm^{-1} . Esto hace que, aunque la diferencia energética entre los niveles no sea la misma (niveles resonantes), los fonones permitan que tengan lugar las CR.

En el caso de los sistemas de Er^{3+}/Yb^{3+} en matriz $\beta-NaYF_4$ estudiados a lo largo de esta tesis, nunca se ha observado una dependencia cúbica con la potencia para la emisión en el rojo a la vez que una dependencia cuadrática en las emisiones verdes. Esto puede ser debido a la diferencia de dopaje y tamaño entre las muestras estudiadas aquí y las empleadas por los autores en sus respectivos trabajos.

En el capítulo 5 (sección 5.1a) se presenta un estudio del proceso de *upconversion* realizado con partículas micrométricas de $\beta-NaYF_4$ dopadas con Er^{3+} e Yb^{3+} . Los resultados obtenidos no permiten determinar de manera inequívoca cuál de los dos mecanismos propuestos es el más adecuado para las muestras estudiadas.

Cada uno de los mecanismos aquí descritos puede ser válido dependiendo del sistema estudiado y las condiciones experimentales. Habrá que tener en cuenta diversos factores como el tamaño, la concentración de los iones dopantes y el medio que rodee a la partícula. Todos estos parámetros determinarán los mecanismos concretos que tendrán lugar en el proceso de *upconversion*.

3.2- Influencia del tamaño: nano y micropartículas.

Existen diferentes fenómenos que pueden disminuir la luminiscencia de las partículas. Estos fenómenos afectan de manera diferente dependiendo del tamaño de la partícula, más concretamente, de la relación superficie/volumen. La luminiscencia se ve afectada negativamente principalmente debido a la existencia de procesos de transferencia de energía no radiativos. El aumento en la probabilidad de estos procesos se debe a la presencia de los fonones de la red, las vibraciones de las moléculas en la superficie (tanto ligandos como disolvente) y los defectos de superficie.[21] Debido a su mayor volumen, las micropartículas presentan una emisión más intensa que las nanopartículas. Esto se debe a que la relación superficie/volumen aumenta al reducirse el tamaño por lo que la proporción de iones en la superficie es mayor en las nanopartículas. Los iones que se encuentran en la superficie de la partícula están en contacto directo con el medio, lo que hace que sean afectados de manera distinta que los iones que se encuentra en el interior. Cuanto mayor sea el número de iones en superficie, más se verá influenciada la emisión total de la partícula.

La luminiscencia de los iones de la superficie se ve afectada por la existencia de defectos de red y el acople con los fonones del medio que hacen posible desexcitaciones fonónicas:

1- Densidad de defectos de red. La eficiencia de *upconversion* disminuye con la densidad de defectos (interrupciones en la periodicidad de la red), que a su vez aumenta al incrementarse la superficie ya que los átomos más externos de la red ajustarán sus posiciones de tal manera que puedan adaptarse a la ausencia de átomos vecinos. Estos defectos proporcionan los canales para que tenga lugar la recombinación no radiativa. Cuando las nanopartículas tienen un tamaño inferior a 15 nm, la densidad de defectos domina sobre el resto de parámetros que determinan las probabilidades de emisión.[21] Disminuyendo el número de defectos de superficie, se pueden sintetizar nanopartículas de muy reducido tamaño pero altamente eficientes.

2- Moléculas en contacto con la partícula. Los iones en la superficie de las partículas son influidos por las moléculas del disolvente o los ligandos que la recubren. Bogdan y colaboradores investigaron el efecto que tiene sobre la luminiscencia la presencia de oleatos en la superficie de nanopartículas de *upconversion*. [22] Vieron que, al eliminar los ligandos de la superficie de las partículas, la emisión total aumentaba. Además, existía una gran diferencia entre la emisión de las partículas sin ligandos dispersas en agua y en agua pesada. En ambos casos, la emisión varía porque los iones de la superficie ceden energía a las moléculas que tienen a su alrededor. Si la energía de vibración (fonones) de las moléculas es adecuada, se pueden desencadenar procesos de decaimiento multifonónico a través de ellas haciendo que la eficiencia de *upconversion* disminuya. Cuanto menor sea el número de fonones necesarios para igualar la energía de la transición, mayor será la probabilidad de que se produzca la transferencia de energía no radiativa.[23] Para el caso de los distintos disolventes, la emisión es mayor cuando las partículas se encuentran en contacto con moléculas de D₂O que cuando están rodeadas por moléculas de H₂O.[22-24] La transferencia de energía a los osciladores O-D es un proceso menos eficiente que la transferencia de energía a los O-H.[25] Esto se debe a que la energía de vibración del enlace O-D es un 70% menor que la del enlace O-H.[24] De esta manera, el número de fonones involucrados en la transferencia de energía a las

moléculas de D₂O es mayor que el necesario para que la energía se transfiera de manera no radiativa a las moléculas de H₂O. Por esta razón, las desexcitaciones no radiativas son más probables cuando la partícula está rodeada de moléculas de agua. Un razonamiento análogo se puede realizar para el caso de las partículas con y sin ligandos en la superficie. Dependiendo de la energía de vibración de las moléculas, la luminiscencia se verá más o menos afectada por la presencia de los ligandos en su superficie.

Los fenómenos descritos afectan a la luminiscencia de las partículas en su conjunto, pero también lo hacen de manera distinta sobre las diferentes bandas de emisión. Debido a esto, una de las principales diferencias entre la emisión de micro y nanopartículas es el cociente de intensidades entre las bandas del rojo ($^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) y el verde ($^2H_{11/2}, ^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$). [21, 22] Al disminuir el tamaño de las nanopartículas, la intensidad de la banda de emisión en torno a 660 nm aumenta respecto de la de 520-550 nm. Esto se debe a que las emisiones en el rojo y el verde se producen por dos caminos de excitación distintos, como se vio en la sección 3.1d. Uno de los caminos por los que se puede poblar el nivel $^4F_{9/2}$ implica la desexcitación no radiativa desde los niveles $^2H_{11/2}$ y $^4S_{3/2}$ (**Figura 3.6**). En principio, la diferencia de energía entre los niveles es muy grande, lo que provoca que la probabilidad de que el proceso de desexcitación no radiativa ocurra sea baja. Sin embargo, gracias a la presencia de las moléculas en la superficie de la partícula, puede asistirse este proceso haciendo que el número de fonones necesarios disminuya e incrementando la probabilidad de transición. Además de este mecanismo, existe otro por el cual el nivel $^4F_{9/2}$ se puebla gracias a la energía cedida por un ion Yb³⁺ cercano desde el nivel $^4I_{13/2}$ (**Figura 3.6**). Para que se pueble este último nivel es necesario que se produzca una emisión no radiativa desde el nivel $^4I_{11/2}$. Como antes, este proceso puede ser asistido por las vibraciones de las moléculas situadas en contacto con los iones de la superficie de la partícula.

3.3- Influencia de la fase cristalina de la matriz.

La red cristalina juega un papel importante en la eficiencia de *upconversion*. El efecto de los fonones de la red en la luminiscencia es un factor determinante a la hora de elegir la matriz donde se incorporarán los iones emisores. Se debe seleccionar una matriz cristalina con baja energía de vibración de los fonones efectivos, de tal manera que se minimice la probabilidad de transferencia de energía no radiativa. De entre todas las matrices que componen las partículas de *upconversion*, NaYF₄ está considerada como la más adecuada para la obtención de emisión en la región visible debido a que los fonones dominantes de esta matriz tienen una energía entre 300 y 400 cm⁻¹. [19] Además, entre las diferentes fases cristalinas, la emisión es 10 veces superior si el cristal se encuentra en fase β que en α . [26] Esto se debe directamente al campo cristalino. [27] Para sistemas asimétricos, las probabilidades de transición entre niveles de capas f aumentan debido al mayor acoplamiento entre los niveles electrónicos 4f y los de capas superiores. Además, si el tamaño de la celda unidad disminuye, la intensidad del campo cristalino aumenta, haciendo que las probabilidades de transición se incrementen.

3.4- Influencia de la geometría: emisión polarizada.

Se dice que la luminiscencia que genera un sistema está polarizada cuando el espectro de emisión depende del estado de polarización de la luz emitida. Una búsqueda en la

bibliografía muestra que se han realizado muy pocos estudios sobre la emisión polarizada de partículas dopadas con tierras raras.[28-32] La existencia de emisiones polarizadas conlleva que la emisión de las partículas cambie con su orientación y, por lo tanto, afecta de manera directa a la interpretación de los resultados basados en el análisis de la luminiscencia generada por partículas individuales.

El origen de la emisión polarizada no está completamente claro. Sin embargo, aquí se presenta una posible explicación a este fenómeno basada en el trabajo publicado por *Chen et al.*[30] Estos autores descubrieron que el espectro de emisión de partículas con forma de disco hexagonal de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ depende de la orientación de la partícula respecto a la dirección de excitación y detección. Como se ha explicado anteriormente (sección 3.1), las probabilidades de transición están íntimamente ligadas con la simetría del centro óptico. Dependiendo de la dirección tanto de propagación como de polarización de la luz dentro del cristal, las probabilidades de las transiciones cambian siempre y cuando el campo cristalino sea anisótropo. Esto hace que la intensidad de emisión de las distintas transiciones cambie dependiendo del estado de polarización de la luz. El hecho importante es que debe existir una anisotropía del campo cristalino para que se produzca la emisión polarizada. Esta anisotropía está determinada por las propiedades ópticas de la partícula. Por ejemplo, los cristales uniaxiales son aquellos que presentan un índice de refracción en una dirección (eje óptico) que es distinto al que poseen las dos direcciones perpendiculares. En este caso, la luz emitida a lo largo del eje óptico tendrá una forma espectral distinta que la que se emita perpendicularmente a él.

3.5- Influencia de la temperatura en la emisión.

La emisión de las partículas luminiscentes es sensible a las características del entorno. En particular, existe una dependencia de la luminiscencia de cierto tipo de partículas con la temperatura. Este fenómeno dio lugar al nacimiento de la denominada termometría luminiscente. Esta técnica se basa en el hecho de que las propiedades de la luz emitida dependen de las características de los niveles energéticos involucrados en la transición electrónica, las cuales están a su vez influenciadas por la temperatura a la que se encuentra el sistema. Por ello, la termometría luminiscente usa el análisis espectral de la emisión para obtener una lectura de la temperatura a la que se encuentra la partícula.

Existen diferentes clases de termometría luminiscente dependiendo de la característica de la luminiscencia que se analice. Estas propiedades luminiscentes están resumidas en la **Figura 3.8**. [33] En ella también se muestra de manera cualitativa cómo cambian esas características con la temperatura. La temperatura puede medirse empleando en análisis del cambio que se produce en la intensidad (**Figura 3.8a**), la posición espectral (**Figura 3.8b**), la vida media (**Figura 3.8c**), la anchura (**Figura 3.8d**), la polarización (**Figura 3.8e**) o la forma espectral de la banda de emisión (**Figura 3.8f**). Debido a que los experimentos de termometría realizados en esta tesis se basan en el análisis de la forma espectral de la banda de emisión de iones Er^{3+} , únicamente esta última técnica se va a describir en detalle.

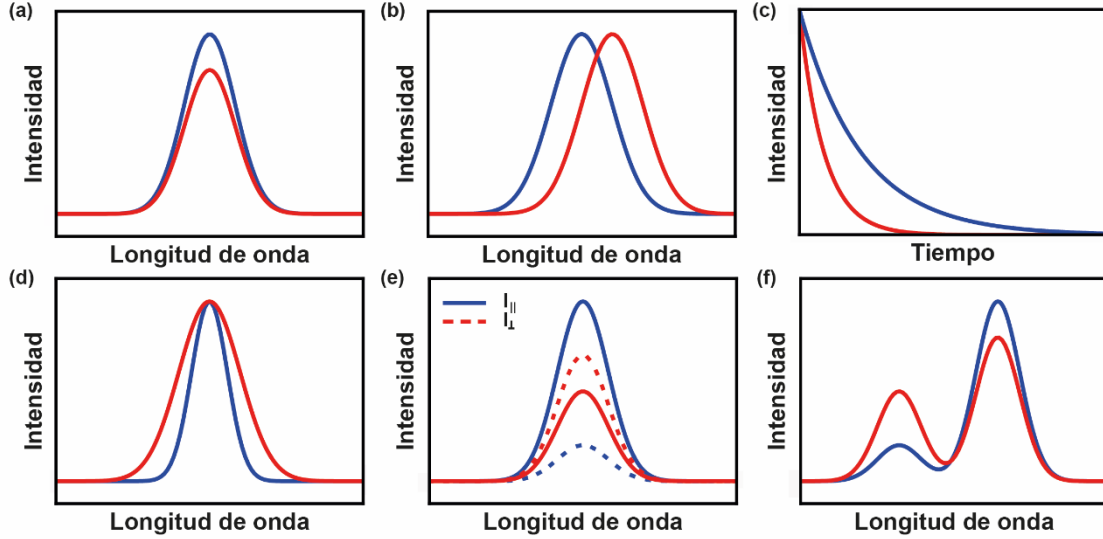


Figura 3.8. Diferentes clases de termometría luminiscente. Termometría luminiscente basada en (a) la intensidad; (b) posición espectral, (c) vida media, (d) ancho de banda, (e) polarización y (f) forma de la banda de emisión.

3.5a-Termometría basada en el cambio de la forma espectral de la emisión.

Esta técnica se basa en el cambio que sufre la forma espectral de la emisión debido a la temperatura (**Figura 3.8f**). De esta manera se puede obtener una medida de la temperatura a través del cociente de intensidades de dos bandas de emisión que pueden proceder del mismo tipo de centro óptico o de dos distintos. En el primer caso, la intensidad relativa entre las bandas de emisión cambia generalmente debido a que se encuentran térmicamente acopladas. En el segundo caso, se saca ventaja de que la emisión de centros ópticos de distinto tipo está afectada por la temperatura de manera diferente. Es importante destacar que, en ambos casos, el cambio en el cociente no está influido por la concentración de iones o la potencia de excitación. Este tipo de termometría luminiscente es característica de partículas dopadas con iones de tierras raras, aunque los puntos cuánticos (*quantum dots*) también presentan cambio en la forma espectral de la emisión con la temperatura.[34, 35]

Esta tesis doctoral se centra en la medida de la temperatura que involucra un único tipo de centro óptico. Este tipo de sistema es el que se va a emplear en los experimentos de medida de perfiles de temperatura mediante el atrapamiento óptico de una única partícula de *upconversion* (sección 5.4). La distribución de población entre los niveles energéticos debida a la temperatura viene determinada por la estadística de Boltzmann:

$$N_2 = N_1 e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (3.16)$$

Donde N_2 y N_1 son las poblaciones electrónicas del nivel de mayor y menor energía, respectivamente, y ΔE es la diferencia de energía entre ellos. La expresión 3.16 muestra que, aunque se pueble únicamente uno de los dos niveles mediante excitación externa, la población se distribuirá entre ambos. El acoplamiento térmico entre dos niveles ocurre si

la diferencia de energía entre los niveles es comparable a $k_B T$, lo que hace que las poblaciones de N_2 y N_1 sean comparables. En el caso del sistema estudiado en esta tesis, la separación energética de los niveles térmicamente acoplados $^4S_{3/2}$ y $^2H_{11/2}$ del ion Er^{3+} es aproximadamente de 900 cm^{-1} ($2 \times 10^{-20} \text{ J}$). Empleando el valor de $k_B T = 4 \times 10^{-21} \text{ J}$ a temperatura ambiente y la diferencia de energía entre los niveles se obtiene que N_2 es el 1% de N_1 .

Como se explicó en la sección 3.1, la intensidad de emisión (I_i) desde esos niveles al fundamental es proporcional a la población del nivel y a la probabilidad de emisión radiativa (A_i) (expresión 3.7). Haciendo el cociente entre las intensidades de emisión de los niveles se obtiene:

$$\frac{I_2}{I_1} \propto \frac{A_2 N_2}{A_1 N_1} = \frac{A_2}{A_1} e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (3.17)$$

De la expresión 3.17 se concluye que se puede obtener una medida de la temperatura a través del cociente de las intensidades de emisión de los niveles térmicamente acoplados. Para ello es necesario realizar una calibración de la emisión de las partículas en función de la temperatura. De esta manera se puede conocer la equivalencia entre el valor del cociente de intensidades y la temperatura a la que se encuentra el sistema. Tomando logaritmos a ambos lados de la expresión 3.17 se obtiene:

$$\ln\left(\frac{I_2}{I_1}\right) = -\frac{\Delta E}{k_B} \frac{1}{T} + cte \quad (3.18)$$

Donde *cte* es una constante. Se puede ver cómo existe una dependencia lineal entre el logaritmo del cociente de intensidades y el inverso de la temperatura.

La comparación entre sistemas termométricos se realiza mediante el valor de la sensibilidad. La sensibilidad relativa está definida como:[36]

$$S_r(T) = \frac{1}{C} \frac{dC}{dT} = \frac{\Delta E}{k_B T^2} \quad (3.19)$$

Donde $C = \frac{I_2}{I_1}$. La expresión 3.19 muestra que cuanto menor sea la diferencia de energía entre los niveles, menor será el valor de la sensibilidad. En esta situación, el valor del cociente tendrá un cambio menor con la temperatura ya que pequeñas variaciones de temperatura darán lugar a mayores redistribuciones de población haciendo que el cociente únicamente se altere ligeramente. Es necesario un valor alto de la sensibilidad para poder apreciar cambios pequeños en la temperatura, los cuales se pueden convertir en grandes cambios en el cociente de intensidades.

La sensibilidad puede emplearse para obtener la resolución en la medida de la temperatura. En los experimentos normalmente se suele elegir una temperatura de referencia (T_0) y se miden incrementos de temperatura respecto a ella. De la expresión 3.19 se obtiene que la diferencia de temperaturas ($T - T_0$) viene dada por la sensibilidad y la diferencia de los cocientes asociados a esas temperaturas ($C - C_0$):

$$T - T_0 = \frac{C - C_0}{C} \frac{1}{S_r} \quad (3.20)$$

La resolución en la medida de la temperatura (ΔT) se obtendrá por propagación de errores de la expresión 3.20:

$$\Delta T = \left| \frac{1}{S_r} \left(\frac{1}{C} - \frac{C-C_0}{C^2} \right) \right| \Delta C + \left| \frac{C-C_0}{C S_r^2} \right| \Delta S_r \quad (3.21)$$

Donde ΔS es la resolución en la sensibilidad (ver anexo A.2):

$$\Delta S_r = \frac{2S_r}{C} \Delta C \quad (3.22)$$

La resolución en el cociente de intensidades (ΔC) vendrá dada por el error a la hora de medir las intensidades:

$$\Delta C = (1 + C) \frac{1}{I_1} \Delta I \quad (3.23)$$

Donde ΔI corresponde con ruido o fondo (*background*) a la hora de realizar la medida. Si se asume que la relación señal-ruido ($\frac{\Delta I}{I}$) es independiente de la longitud de onda, la expresión 3.23 queda:

$$\Delta C = (1 + C) \frac{\Delta I}{I} \quad (3.24)$$

Existen diferentes estudios que han empleado partículas dopadas con iones Er^{3+} como termómetros. Las sensibilidades publicadas van desde 0.2 a 2.3 %K⁻¹ dependiendo de las características de la partícula.[36] En mi opinión, el ion Er^{3+} es un buen agente medidor de temperatura por diferentes razones:

- *Gran separación energética.* La diferencia de energía entre los niveles $^4\text{S}_{3/2}$ y $^2\text{H}_{11/2}$ térmicamente acoplados es del orden de 900 cm⁻¹. Esto hace que la sensibilidad sea alta y permita detectar pequeños cambios de temperatura a través de grandes cambios en el cociente de intensidades. Además, aunque la separación energética sea alta, los niveles están acoplados, permitiendo las medidas ratiométricas.
- *Altas intensidades de emisión.* Se pueden sintetizar partículas con una alta eficiencia de luminiscencia en el verde, lo que facilita la obtención de espectros de emisión cuya intensidad sea varios órdenes de magnitud mayor que la señal de fondo. De esta manera, se puede medir el cociente de intensidades con alta resolución, lo que se traduce en una reducción en el error de la medida de la temperatura.
- *Repetitividad de las medidas.* En los estudios realizados en esta tesis era necesario que se obtuvieran los mismos resultados para partículas distintas dentro de una misma muestra. Los procesos de síntesis permitieron obtener partículas en las que la forma espectral y en muchos casos la intensidad total medidas era idéntica para todas las partículas estudiadas. Esto asegura la reproducibilidad de los experimentos de atrapamiento de partículas.

3.6- Referencias.

1. J. Solé, et al., *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids*. 2005: John Wiley & Sons.

2. K. N. Shinde, et al., *Phosphate Phosphors for Solid-State Lighting*. Springer Series in Materials Science. 2012: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. XIV.
3. T. Jung, et al., *The preferred upconversion pathway for the red emission of lanthanide-doped upconverting nanoparticles, NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(20): p. 13201.
4. S. Bedo, et al., *SATURATION OF THE 2.71-MU-M LASER OUTPUT IN ERBIUM-DOPED ZBLAN FIBERS*. Optics Communications, 1995. **116**(1-3): p. 81.
5. J. A. Capobianco, et al., *Optical spectroscopy, fluorescence dynamics and crystal-field analysis of Er³⁺ in YVO₄*. Chemical Physics, 1997. **214**(2-3): p. 329.
6. H. Steinkemper, et al., *Stark level analysis of the spectral line shape of electronic transitions in rare earth ions embedded in host crystals*. New Journal of Physics, 2013. **15**.
7. G. H. Dieke, *Spectra and energy levels of rare earth ions in crystals*. 1968, New York: Interscience.
8. B. Henderson, *Optical spectroscopy of inorganic solids*, ed. G. F. Imbusch. 1989, Oxford [Oxfordshire] :: Clarendon Press ;. 645.
9. K. Binnemans, *Interpretation of europium(III) spectra*. Coordination Chemistry Reviews, 2015. **295**: p. 1.
10. F. Auzel, *Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids*. Chemical Reviews, 2004. **104**(1): p. 139.
11. H. Dong, et al., *Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications*. Chemical Society Reviews, 2015. **44**(6): p. 1608.
12. F. E. Auzel, *Materials and devices using double-pumped-phosphors with energy transfer*. Proceedings of the IEEE, 1973. **61**(6): p. 758.
13. G. Chen, et al., *Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics*. Chemical Reviews, 2014. **114**(10): p. 5161.
14. H. Deng, et al., *Controlled Synthesis and Upconverted Avalanche Luminescence of Cerium(III) and Neodymium(III) Orthovanadate Nanocrystals with High Uniformity of Size and Shape*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(6): p. 2032.
15. F. Wang, et al., *Tuning upconversion through energy migration in core-shell nanoparticles*. Nat Mater, 2011. **10**(12): p. 968.
16. F. Auzel, *COMPTEUR QUANTIQUE PAR TRANSFERT D'ENERGIE ENTRE DEUX IONS DE TERRES RARES DANS UN TUNGSTATE MIXTE ET DANS UN VERRE*. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie B, 1966. **262**(15): p. 1016.
17. N. Bloembergen, *Solid State Infrared Quantum Counters*. Physical Review Letters, 1959. **2**(3): p. 84.
18. R. B. Anderson, et al., *Revisiting the NIR-to-Visible Upconversion Mechanism in β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2014. **5**(1): p. 36.
19. Y. Cho, et al., *Spectral evidence for multi-pathway contribution to the upconversion pathway in NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ phosphors*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017. **19**(10): p. 7326.
20. T. Catunda, et al., *Spectroscopic properties and upconversion mechanisms in Er^{3+} -doped fluoroindate glasses*. Physical Review B, 1996. **53**(10): p. 6065.
21. J. Zhao, et al., *Upconversion luminescence with tunable lifetime in NaYF₄:Yb,Er nanocrystals: role of nanocrystal size*. Nanoscale, 2013. **5**(3): p. 944.
22. N. Bogdan, et al., *Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles*. Nano Letters, 2011. **11**(2): p. 835.
23. J. L. Kropp and M. W. Windsor, *Luminescence and Energy Transfer in Solutions of Rare-Earth Complexes. I. Enhancement of Fluorescence by Deuterium Substitution*. The Journal of Chemical Physics, 1965. **42**(5): p. 1599.
24. T. Harada and H. Yoshimura, *Synthesis of rare earth doped yttrium-vanadate nanoparticles encapsulated within apoferritin*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(28): p. 14947.

25. W. D. Horrocks and D. R. Sudnick, *Lanthanide ion probes of structure in biology. Laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules*. Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(2): p. 334.
26. S. Heer, et al., *Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide-Doped NaYF₄ Nanocrystals*. Advanced Materials, 2004. **16**(23-24): p. 2102.
27. F. Zhang, *Photon Upconversion Nanomaterials*. Nanostructure Science and Technology. 2015: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 416.
28. J. Zhou, et al., *Ultrasensitive Polarized Up-Conversion of Tm³⁺-Yb³⁺ Doped beta-NaYF₄ Single Nanorod*. Nano Letters, 2013. **13**(5): p. 2241.
29. G. Dong, et al., *Controllable Synthesis and Peculiar Optical Properties of Lanthanide-Doped Fluoride Nanocrystals*. Chempluschem, 2014. **79**(4): p. 601.
30. P. Chen, et al., *Polarization modulated upconversion luminescence: single particle vs. few-particle aggregates*. Nanoscale, 2015. **7**(15): p. 6462.
31. P. Rodríguez-Sevilla, et al., *Determining the 3D orientation of optically trapped upconverting nanorods by in situ single-particle polarized spectroscopy*. Nanoscale, 2016. **8**(1): p. 300.
32. P. Rodríguez-Sevilla, et al., *Optical Torques on Upconverting Particles for Intracellular Microrheometry*. Nano Letters, 2016. **16**(12): p. 8005.
33. D. Jaque and F. Vetrone, *Luminescence nanothermometry*. Nanoscale, 2012. **4**(15): p. 4301.
34. U. Rocha, et al., *Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles*. Acs Nano, 2013. **7**(2): p. 1188.
35. P. Rodríguez-Sevilla, et al., *Thermal Scanning at the Cellular Level by an Optically Trapped Upconverting Fluorescent Particle*. Advanced Materials, 2016. **28**(12): p. 2421.
36. C. D. S. Brites, et al., *Thermometry at the nanoscale*. Nanoscale, 2012. **4**(16): p. 4799.

CAPÍTULO 4: Métodos experimentales.

En este capítulo se van a detallar los métodos experimentales empleados durante la tesis doctoral. En primer lugar se presentan los diferentes métodos de síntesis empleados para la obtención de las partículas estudiadas. Se hace especial hincapié en los métodos solvotermales ya que esta técnica fue la más utilizada. Además, una estancia realizada en la National University of Singapore (Singapur), en los laboratorios del grupo de investigación liderado por Liu Xiaogang, permitió ampliar los conocimientos acerca de este método de síntesis.

Tras la explicación de los métodos de síntesis, se describe el montaje experimental empleado, que consiste en un sistema de pinzas ópticas modificado para la realización de experimentos de espectroscopía de luminiscencia. Dentro de esta descripción se incluye una discusión acerca de diferentes aspectos necesarios para el atrapamiento óptico de partículas.

Por último se detallan los aparatos de medida empleados para la caracterización de las muestras y los métodos usados para la incubación de las células empleadas en los experimentos *in vitro*.

4.1- Síntesis de partículas.

En esta sección se van a describir los distintos métodos empleados para la síntesis y posterior modificación de las partículas estudiadas a lo largo de esta tesis.

4.1a- Microemulsiones.

Una microemulsión es una dispersión termodinámicamente estable de dos fluidos inmiscibles que es estabilizada por la incorporación de surfactantes.[1, 2] Un surfactante es un compuesto químico formado por una cabeza polar (hidrofílica) y una cadena no polar (hidrofóbica). De esta manera, su estructura les permite actuar como frontera entre disolventes polares y no polares. Cuando se mezclan un disolvente polar (agua) con uno no polar en la presencia de surfactantes, estos últimos tienden a formar agregados llamados micelas. Dependiendo de la proporción entre los dos disolventes, el disolvente polar se encontrará en el interior de las micelas (micelas invertidas) o fuera (micelas normales). Cuando se añaden los reactivos, éstos se incorporarán a la fase que les corresponda. Las micelas son micro o nanoreactores donde tiene lugar la reacción química que da lugar a la formación y crecimiento de las partículas.

Un proceso de microemulsión general consiste en la mezcla de los disolventes no polares junto con la dispersión acuosa de los primeros reactivos en la presencia de surfactantes y bajo agitación. De esta manera se generan las micelas. Después, la reacción se activa añadiendo los siguientes reactivos que formarán parte del interior de las micelas. Finalmente, se deja reaccionar bajo agitación durante el periodo de tiempo necesario y a temperatura ambiente.

Las partículas de *upconversion* pueden ser sintetizadas empleando microemulsiones.[3, 4] Sin embargo, esta técnica es normalmente empleada para el crecimiento de capas externas sobre partículas previamente sintetizadas.[5, 6] A continuación se describe el proceso llevado a cabo para el recubrimiento de nanopartículas de *upconversion* con una capa de sílice de grosor variable.

Muestra I: Nanoartículas de NaYF₄: Er³⁺, Yb³⁺ recubiertas de sílice.

Estas partículas están formadas por un núcleo (partícula de *upconversion*) recubierto de una capa de sílice. En primer lugar se prepararon los núcleos compuestos de fluoruro de sodio ytrio (NaYF₄) dopado con iones de Er³⁺ e Yb³⁺, con un tamaño medio de 26 nm. Una vez obtenidos los núcleos, éstos se recubrieron con una capa de sílice de grosor variable (ver **Figura 4. 1**). El procedimiento experimental puede consistir en una única reacción que da lugar al tamaño final de recubrimiento o en un conjunto de reacciones consecutivas que permiten aumentar poco a poco el tamaño total de la partícula.

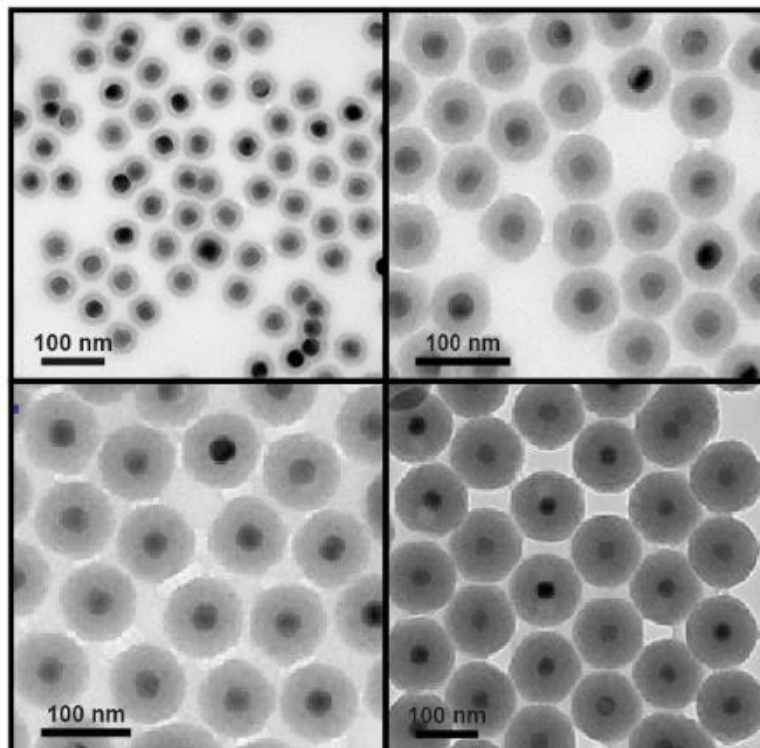


Figura 4. 1 Nanoartículas de NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺ recubiertas de sílice. Imágenes de TEM de las diferentes partículas obtenidas.

A continuación se van a describir dos procedimientos distintos que permiten el crecimiento de una capa de sílice sobre núcleos ya formados.

El primer proceso es una modificación del anteriormente publicado por Asher in 1994.[7] En este método los disolvente polares se encuentran en el interior de las micelas invertidas, por lo que los reactivos deben encontrarse en medios hidrófilos.

Reactivos: Se indica la concentración final de cada reactivo en la reacción cuyo volumen total es 12 ml.

- Dispersión de nanopartículas (0.123 mg/ml) en etanol (medio polar).
- Tetraetil ortosilicato (TEOS, 0.179 M). Es el precursor de la sílice que será hidrolizado para crear el recubrimiento.
- Disolución de amoníaco en agua (0.15 M). Es el catalizador de la reacción de hidrólisis.
- Surfactante: Triton X-100 (0.179 M).

- 3-octanol (0.269 M). Este compuesto actúa como cosurfactante y estabiliza las micelas ayudando a que las esferas finales sean más uniformes.
- Agua (1.069M). Es el medio donde tendrá lugar la reacción.
- Ciclohexano (medio no polar). Se añade una cantidad tal que el volumen total de la reacción sea 12 mL.

Procedimiento:

1. En primer lugar se añade el ciclohexano (9.192 ml) a un vial de 15 ml donde se realizará la reacción. Después se incorporan 0.212 ml de la dispersión de partículas seguido de 0.231 ml de agua purificada. En este momento los disolventes polares y no polares se encuentran en fases separadas.
2. Para la formación de las micelas se añaden 0.514 ml de 3-octanol y 1.389 g de Triton X-100.
3. La dispersión se mezcla empleando un mezclador de vórtice y un baño de ultrasonidos hasta que los surfactantes quedan bien distribuidos.
4. Se agita la dispersión durante 5 min más en el baño de ultrasonidos para que las micelas se formen y distribuyan uniformemente.
5. Se coloca el vial en un agitador mecánico a 750 rpm.
6. Se añade un total de 70 μ l de disolución de amoníaco lentamente, gota a gota.
7. Al cabo de 10 min se añaden 0.476 ml de TEOS del mismo modo que la disolución de amoníaco.
8. Se deja reaccionar durante 24 h bajo agitación mecánica.

Este primer procedimiento descrito permite crear una pequeña capa de sílice alrededor de los núcleos. Para aumentar el grosor de esa capa se puede emplear un segundo método denominado Stöber.[8] En este procedimiento, se añade más precursor de sílice (TEOS) y más catalizador de la reacción (amoníaco en agua) a la disolución resultante del proceso anteriormente descrito. De esta manera, se emplean las micelas invertidas ya creadas donde se encuentran las partículas recubiertas. Al añadir más reactivos se continúa el proceso anterior y se incrementa el grosor de la capa de sílice.

Como ya se ha comentado, el tamaño final de partícula puede obtenerse en un único paso o en varios sucesivos. El empleo de dos o más pasos permite reducir el número de nucleaciones secundarias (formación de partículas compuestas por sílice únicamente en vez de crecimiento de la capa que recubre a los núcleos) que tienen lugar cuando se añade gran cantidad de reactivo a la vez.

Crecimiento paso a paso: Bajo agitación mecánica a 750 rpm se añaden, gota a gota, 0.218 ml de TEOS a 5.5 ml de la dispersión de partículas recubiertas de sílice obtenida directamente del proceso anterior. Inmediatamente después, se añaden, también gota a gota, 32 μ l de la disolución de amoníaco en agua. Finalmente, se deja reaccionar durante 24 h bajo agitación. Este proceso constituye un único paso que se puede repetir varias veces hasta alcanzar el tamaño deseado.

Crecimiento en un único paso: El procedimiento es el mismo que el anterior, pero en este caso se añade la cantidad total de TEOS y amoníaco en agua que se añadiría en los sucesivos pasos.

4.1b- Procesos solvotermales.

Un proceso solvotermal es una reacción química que tiene lugar en un sistema cerrado en presencia de un disolvente que se encuentra a una temperatura mayor que su punto de ebullición normal, por lo que la presión del sistema es superior a 1 atm.[9-11] Si el disolvente empleado es agua, el proceso se conoce como hidrotermal.

Un proceso solvotermal típico para la síntesis de partículas de *upconversion* se divide en dos pasos:

- 1- En primer lugar, la dispersión de los precursores es preparada en el interior de un vaso de teflón. Los precursores de los iones de lantánidos y de los que componen a matriz se mezclan junto con los surfactantes en un orden determinado y bajo agitación.
- 2- El vaso de teflón se introduce en un autoclave, que se sella y se calienta a alta temperatura (alrededor de 200 °C) durante varias horas empleando un horno.

Dependiendo de los parámetros (químicos y físicos) que rigen la reacción, el resultado de la síntesis puede variar. Los procedimientos aquí descritos pueden modificarse con el fin de alterar el tamaño final de la partícula y su geometría.

A continuación se detallan los procedimientos seguidos para la síntesis de las muestras II, III y IV.

Muestra II: Micropartículas en forma de disco de $\text{NaYF}_4:0.5\%\text{Er}^{3+},5\%\text{Yb}^{3+}$.

El resultado final de este procedimiento hidrotermal da lugar a partículas en forma de disco hexagonal con una matriz cristalina de fluoruro de sodio ytrio (NaYF_4) dopada con un 0.5 % de iones Er^{3+} y un 5% de iones Yb^{3+} (ver **Figura 4.2**). Para la obtención de los distintos tamaños de partícula se codopó la muestra con iones de gadolinio manteniéndose el resto de parámetros constantes. El tamaño de las partículas se reduce al aumentar la concentración de iones Gd^{3+} debido a que la sustitución de iones Y^{3+} por Gd^{3+} hace que la densidad de electrones en la superficie de los cristales (partículas) aumente. De esta manera, la difusión de iones F^- en la superficie de los cristales se ralentiza debido a la mayor repulsión de carga. Esto produce que las partículas no puedan crecer como lo harían en ausencia de Gd^{3+} . [12]

A continuación se presentan los reactivos empleados y el procedimiento seguido.

Disolvente: agua.

Reactivos:

- Surfactante: Disolución acuosa de citrato de sodio (0.3 M).
- Iones lantánidos: disoluciones acuosas (0.3 M) de las sales nitratos ($\text{Ln}(\text{NO}_3)_3$) de los lantánidos necesarios (Ln = erbio, yterbio, ytrio).
- Precursores de la matriz: disolución acuosa de fluoruro de sodio (0.5 M).

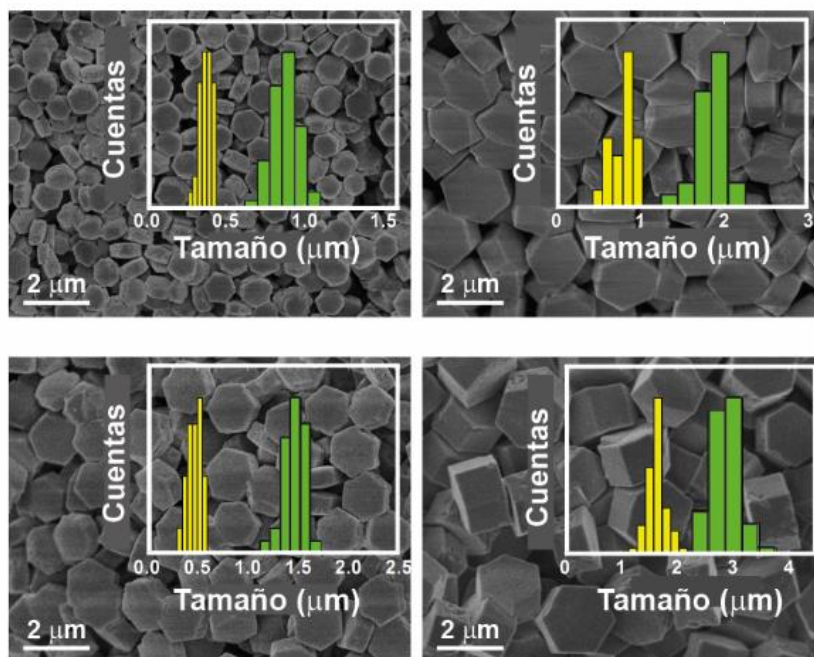


Figura 4.2 Micropartículas en forma de disco de $\text{NaYF}_4:0.5\%\text{Er}^{3+},5\%\text{Yb}^{3+}$. Imágenes de TEM e histograma de tamaños de las diferentes partículas.

Procedimiento:

- 1- Preparación de la mezcla de las sales de lantánidos en la proporción deseada. La cantidad total de lantánidos es 0.4 mmol, de la cual un 94.5 % es ytrio, un 5% es yterbio y un 0.5 % es erbio. Se mezclan 1.890 ml de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$, 0.1 ml de $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ y 0.01 ml de $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$.
- 2- Se incorporan a un vaso de teflón (de 14 ml de volumen), bajo agitación, 0.5 ml de la disolución de citrato de sodio, la mezcla de las sales de lantánidos ya preparada y 9.6 ml de fluoruro de sodio. Se deja agitar durante 20 min para asegurar que los reactivos queden bien disueltos.
- 3- Se introduce el vaso de teflón en el autoclave, se sella y se calienta a 220 °C durante 12 h.
- 4- Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Las partículas sintetizadas tienen un tamaño de micras por lo que se han depositado en el fondo del vaso debido a su peso. Se elimina el sobrenadante y se conserva el sólido.
- 5- Las partículas se lavan dos veces empleando agua (6000 rpm durante varios minutos).

Las partículas sintetizadas son dispersables en agua y otros disolventes polares sin necesidad de que se realice ningún tratamiento adicional de la superficie. Esto se debe a las moléculas de citrato de sodio presentes en la superficie de las partículas.

Muestra III: Nanopartículas de $\text{SrF}_2:2\%\text{Er}^{3+},20\%\text{Yb}^{3+}$.

Esta muestra fue sintetizada empleando el método hidrotermal desarrollado por Pedroni y colaboradores.[13, 14] Las partículas obtenidas son esféricas con una matriz de fluoruro de estroncio dopada con un 2% de Er^{3+} y un 20% de Yb^{3+} (ver **Figura 4.3**).

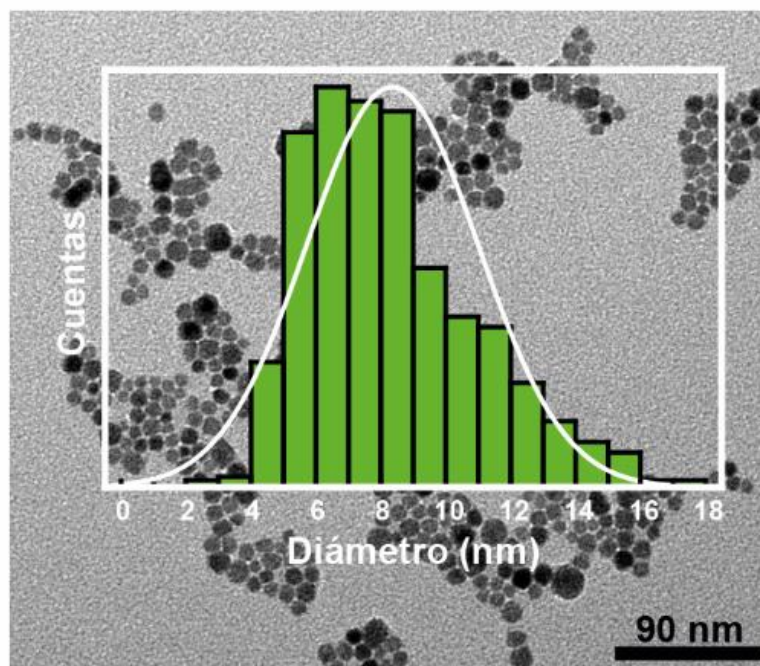


Figura 4.3 Nanopartículas de $\text{SrF}_2:2\%\text{Er}^{3+},20\%\text{Yb}^{3+}$. Imagen de TEM e histograma de tamaños de la muestra.

A continuación se presentan los reactivos empleados y el procedimiento seguido.

Disolvente: agua.

Reactivos:

- Surfactante: Disolución acuosa de citrato de sodio dihidratado (1 M).
- Iones lantánidos: disoluciones acuosas de ErCl_3 ($\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y YbCl_3 ($\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Precursores de la matriz: dispersión acuosa de cloruro de estroncio ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y fluoruro de amonio.

Procedimiento:

- 1- Se añaden a un vaso de teflón (de 50 ml de volumen) cantidades estequiométricas de las disoluciones acuosas de SrCl_2 , YbCl_3 , ErCl_3 y 7 ml de agua pura. La cantidad total de cationes es 3.5 mmol.
- 2- Bajo agitación, se añaden 20 ml de la disolución acuosa de citrato.
- 3- Se añade una cantidad de fluoruro de amonio tal que la relación molar entre el metal y el fluoruro sea 2.5.
- 4- La mezcla se introduce en un vaso de teflón que se sella y se calienta a 190 °C durante 6 h.
- 5- Después de que la dispersión resultante se enfríe a temperatura ambiente, se recuperan las nanopartículas precipitándolas con acetona y se lavan con una disolución de agua y acetona.

Las partículas sintetizadas son dispersables en agua sin la necesidad de un tratamiento de superficie posterior gracias a las moléculas de citrato presentes en la superficie.

Muestra IV: Partículas cilíndricas de $\text{NaYF}_4:2\%\text{Er}^{3+},18\%\text{Yb}^{3+}$.

Para la síntesis de esta muestra se empleó un protocolo ya publicado en el que se emplea radiación de microondas como fuente de calor.[15] Este procedimiento hidrotermal da lugar a partículas cilíndricas con una matriz cristalina de fluoruro de sodio ytrio dopada con un 2 % de iones Er^{3+} y un 18% de iones Yb^{3+} (ver **Figura 4.4**).

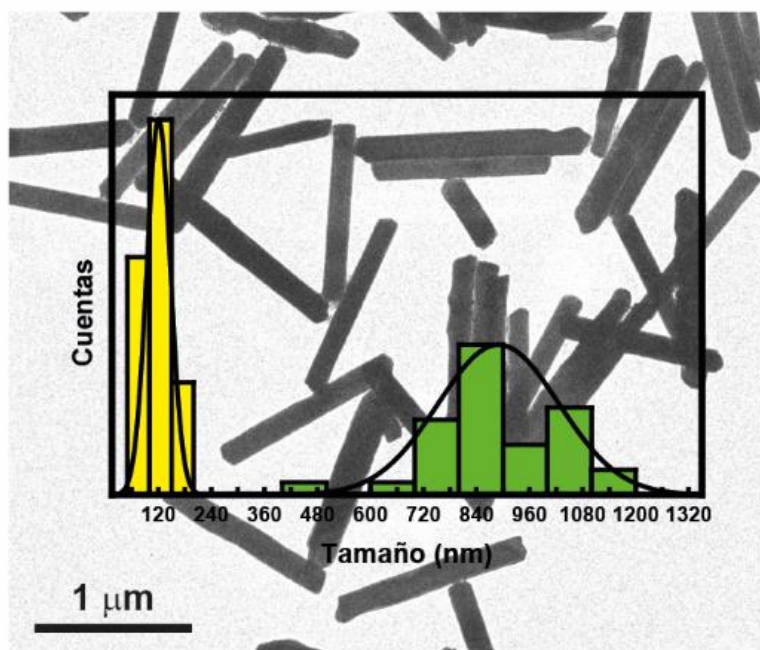


Figura 4.4 Partículas cilíndricas. Imagen de TEM de las partículas cilíndricas de $\text{NaYF}_4:2\%\text{Er}^{3+},18\%\text{Yb}^{3+}$ junto con los histogramas de tamaños.

A continuación se presentan los reactivos empleados y el procedimiento seguido.[15]

Disolventes: etanol (21.7 mM) y agua.

Reactivos:

- Surfactante: ácido oleico (90% en peso).
- Iones lantánidos: óxidos de los iones lantánidos necesarios.
- Precursores de la matriz: disolución acuosa de hidróxido sódico (17.5 mM) y disolución acuosa de fluoruro de sodio (7.2 mM).

Procedimiento:

- 1- En primer lugar, se obtienen los precursores de los iones lantánidos. En un vaso de teflón se mezclan 0.6 mmol de los óxidos de lantánidos en la proporción deseada (2% Er, 18% Yb y 80% Y) con 1 ml de HNO_3 . El vaso se introduce en un reactor de microondas (MAGNUM II ERTEC MV 02-02) y se calienta a 250 °C durante 1h. De esta manera se obtienen las sales nitratos de los lantánidos.
- 2- Se mezclan las sales nitratos obtenidas con 14 ml de agua pura, 0.7 g de la disolución de hidróxido sódico, 7.7 g de ácido oleico, 10 g de etanol y 0.3 g de fluoruro de sodio. Se agita durante 30 min.
- 3- Se transfiere la mezcla a un vaso de teflón, se sella y se introduce en el reactor de microondas en el que se calienta a 250 °C durante 8.5 h.

- 4- Las partículas sintetizadas se recogen por centrifugación (12000 rpm durante 15 min) y se lavan dos veces con etanol.
- 5- Finalmente las partículas se redispersan en ciclohexano (disolvente no polar).

Para el uso de estas partículas en experimentos de atrapamiento óptico, se las sometió al proceso de eliminación de ligandos publicado por Bogdan y colaboradores.[16] En este procedimiento las partículas son tratadas con ácido clorhídrico (pH 4) con el fin de eliminar los oleatos presentes en su superficie. De esta manera se obtienen partículas dispersables en agua al no tener ligandos en su superficie.

4.1c- Descomposiciones termal.

Los procesos de descomposición termal son ampliamente usados para la síntesis de nanopartículas de *upconversion*. [17] Un proceso típico consiste en la adición de los precursores orgánicos de los lantánidos (acetatos) a una mezcla de surfactantes (ácido oleico, 1-octadeceno, y, a veces, oleilamida) a temperatura ambiente. Después, la disolución se calienta a unos 165 °C durante 30 min bajo agitación y en una atmósfera inerte. De esta manera se elimina el oxígeno y el agua de la mezcla. Posteriormente, la disolución se calienta a una temperatura que usualmente es mayor de 300 °C por un cierto periodo de tiempo, aún en la atmósfera inerte. Finalmente, se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente para obtener las partículas.

Muestra V: Nanopartículas de NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺ de diferentes tamaños

A continuación se detallan los diferentes procesos empleados para la síntesis de nanopartículas de fluoruro de sodio ytrio dopadas con iones de Er³⁺ e Yb³⁺ de tamaños comprendidos entre 8 y 200 nm (ver **Figura 4.5**).

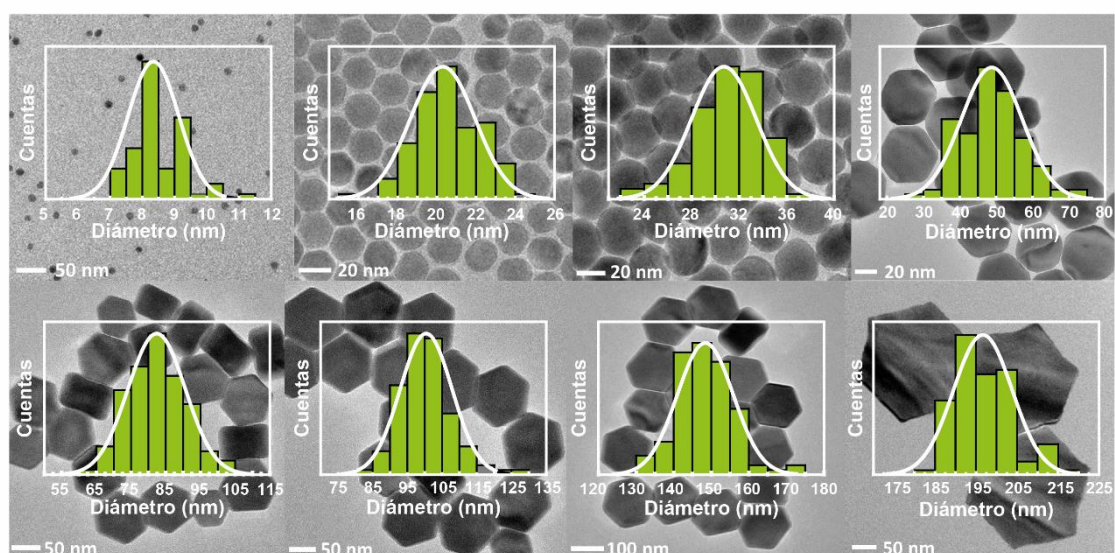


Figura 4.5 Nanopartículas en forma de disco de NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺. Imágenes TEM y los respectivos histogramas de tamaños para las partículas en forma de disco de diferentes diámetros.

Aunque se siguieron diferentes procedimientos dependiendo del tamaño final de partícula deseado, en todos ellos se emplearon los mismos reactivos.

Reactivos:

- Surfactante: ácido oleico y 1-octadeceno.
- Iones lantánidos: óxidos de los iones lantánidos necesarios.
- Precursores de la matriz: hidróxido sódico y fluoruro de amonio

Preparación de los acetatos de lantánidos: Este paso es común a todos los procedimientos. Se mezclan cantidades estequiométricas de los óxidos de lantánidos necesarios con una disolución acuosa de ácido acético (50%). La mezcla resultante se calienta bajo agitación hasta obtener una disolución transparente. Posteriormente se evaporan los disolventes durante 24 h a 130 °C en condiciones de vacío para obtener los precursores.

Nanopartículas de 8 nm de diámetro.

Las partículas de este tamaño se sintetizaron siguiendo el protocolo publicado por Rinkel y colaboradores.[18]

1. Se añadieron cantidades estequiométricas de los acetatos de los lantánidos (un total de 0.75 mmol) a un vaso de teflón junto con 20 mL de ácido oleico y 20 ml de octadeceno. La mezcla se calentó a 140 °C en condiciones de vacío durante 30 min para formar oleatos de los lantánidos.
2. La temperatura se disminuyó hasta los 50 °C y se incorporaron a la mezcla 18 mmol de fluoruro de amonio y 13 mmol de hidróxido sódico previamente disueltos en el 20 ml de metanol. Posteriormente, se agitó la mezcla durante 30 min a 70 °C para evaporar el metanol presente en la mezcla.
3. Una vez eliminado el metanol, se elevó aún más la temperatura hasta los 300 °C en atmósfera de nitrógeno y se dejó reaccionar durante 30 min.
4. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para recuperar las nanopartículas precipitándolas empleando etanol y bajo centrifugación a 15000 rpm durante 20 min.
5. Las nanopartículas se redispersaron en hexano y se lavaron de nuevo con etanol.
6. Finalmente, las partículas fueron redispersadas en cloroformo.

Nanopartículas de 20 nm de diámetro.

Estas partículas fueron sintetizadas empleando una modificación del protocolo publicado por Abel y colaboradores.[19]

1. Se añadieron cantidades estequiométricas de los acetatos de los lantánidos (total de 2.5 mmol) a un vaso de teflón junto con 15 ml de ácido oleico y 38 ml de octadeceno. La mezcla se calentó a 140 °C en condiciones de vacío durante 30 min tanto para formar oleatos de los lantánidos como para eliminar todo el oxígeno y agua presentes
2. La temperatura se disminuyó hasta los 50 °C y se incorporaron a la mezcla 10 mmol de fluoruro de amonio y 6.25 mmol de hidróxido sódico previamente disueltos en el 20 ml de metanol. Posteriormente, se agitó la mezcla durante 30 min a 70 °C para evaporar el metanol presente en la mezcla.

3. Una vez eliminado el metanol, se incrementó aún más la temperatura hasta los 300 °C en atmósfera de nitrógeno y se dejó reaccionar durante 1h.
4. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para recuperar las nanopartículas precipitándolas empleando acetona y n-hexano y bajo centrifugación a 10000 rpm durante 10 min.
5. Las nanopartículas se lavaron empleando etanol.
6. Finalmente, las partículas fueron redispersadas en cloroformo.

Nanopartículas de tamaños comprendidos entre 30 y 200 nm de diámetro.

Partículas en este intervalo de tamaños se sintetizaron empleando un protocolo modificado del publicado por Huang y colaboradores.[20] Estos autores proponen la incorporación de iones ópticamente inertes (que no afectan a las propiedades luminiscentes de la partícula a la longitud de onda de excitación empleada) para influir en la nucleación y el crecimiento de las partículas, lo que se traduce en un cambio en el tamaño final. En este caso, parte de los iones Y^{3+} son reemplazados por iones de Lu^{3+} de radio iónico menor, lo que beneficia el crecimiento de las nanopartículas al reducirse el proceso de nucleación. Durante la reacción de síntesis, los iones en dispersión se emplean principalmente en el crecimiento de la partícula y no en la generación de otras nuevas.

Los diferentes tamaños de partículas se obtuvieron bajo las mismas condiciones experimentales, pero empleando diferente concentración de iones Lu^{3+} : 2, 10, 20, 30, 40 y 50% para dar lugar a diámetro de partícula aproximados de 30, 50, 80, 100, 150 y 200 nm, respectivamente. El proceso de síntesis seguido es equivalente al empleado para la síntesis de las nanopartículas de 20 nm de diámetro, pero en este caso se incorporaron los iones Lu^{3+} con el resto de iones lantánidos.

4.1d- Modificación de la superficie de las partículas.

La totalidad de los experimentos de atrapamiento óptico se ha realizado en dispersiones acuosas de las partículas. Algunos de los métodos de síntesis descritos dan lugar a partículas no dispersables en agua debido a los ligandos hidrófobos presentes en su superficie. Por esta razón, para la realización de los experimentos de atrapamiento óptico es necesario modificar la superficie de las partículas con el fin de hacerlas dispersables en agua.

Se van a describir dos procedimientos. En el primero de ellos se obtienen partículas desnudas sin ligandos en la superficie. En el segundo se intercambian los ligando hidrófobos por unos hidrófilos. Además se describe un proceso por el que se puede modificar de manera controlada el potencial zeta de la partícula.

Procedimiento 1: Eliminación de las moléculas de oleato en la superficie de partículas dispersables en disolventes no polares.

El proceso comienza con el cambio del disolvente (de uno no polar a uno polar) en el que las partículas están dispersas, seguido por la eliminación de los ligandos de la superficie empleando una disolución acuosa de ácido clorhídrico en proporción 1:1 con el volumen

total de la dispersión de partículas. Se pueden encontrar procedimientos similares en la literatura.[16, 21] A continuación se detallan los pasos a seguir:

- 1- Se añaden unos pocos mililitros (1 o 2 ml) de etanol a la dispersión de partículas con el fin de facilitar su precipitación. Se agita la muestra y se centrifuga durante 3 min a 6000 rpm. En este primer paso, el tiempo y velocidad de centrifugado no son parámetros cruciales ya que las partículas no son muy estables en el disolvente polar (etanol) y precipitan fácilmente.
- 2- Una vez que el sobrenadante se elimina después de la centrifugación, se añaden 2 ml de etanol y se mezcla empleando un baño de ultrasonidos con el fin de redispersar las partículas.
- 3- Posteriormente se separa la disolución en dos eppendorf para el lavado. Se rellenan los eppendorf con etanol y se sonica de nuevo. Es conveniente realizar los lavados en recipientes pequeños ya que cuanto menor sea el volumen total, menor es el número de partículas que se pierden con los lavados. Sin embargo, es conveniente que el volumen no sea muy pequeño para que se pueda realizar bien el lavado. Una vez agitada la muestra en el baño de ultrasonidos, se centrifuga de nuevo y se elimina el sobrenadante. Este procedimiento constituye un lavado.
- 4- Al producto del lavado anterior se le añade 1 ml de etanol y se agita para redispersar la muestra. Después, se añade 1 ml de ácido clorhídrico 2M y se agita la muestra de nuevo. En este momento, las partículas deben ser coloidales, lo que asegura que todos los ligandos han sido eliminados de su superficie y han pasado a formar parte del disolvente.
- 5- Para recoger las partículas sin ligandos se centrifuga la muestra a 13000 rpm durante 20 min. En este caso se necesita un tiempo más largo y una velocidad de centrifugado mayor debido a que las partículas son más estables en el disolvente polar que antes de eliminar los ligandos. En el preciso momento en el que el centrifugado ha terminado, se elimina el sobrenadante. Este proceso debe ser rápido para evitar que las partículas se redispersen al acabar el centrifugado. En este momento del proceso, el precipitado de partículas debe haber cambiado de color indicando que los ligandos han sido eliminados. El color amarillento presente en las partículas durante el paso anterior se debía la presencia de las moléculas de oleato. Ahora es el sobrenadante el que tiene un color amarillento.
- 6- Por último, se lava la dispersión de partículas dos veces empleando etanol centrifugando durante 20 min a 13000 rpm. Si el sobrenadante es suficientemente transparente (ya no presenta el color amarillento debido a las moléculas de oleato), el número de lavados puede reducirse a uno. Es importante mencionar que, cuantos más lavados se realicen, mayor será el número de partículas que se pierdan durante el proceso.
- 7- Finalmente, las partículas pueden redispersarse en etanol o agua para su almacenaje.

Procedimiento 2: Eliminación de las moléculas de oleato en la superficie de nanopartículas y su sustitución por moléculas de citrato.

En este procedimiento se intercambian las moléculas de oleato de la superficie de las nanopartículas por moléculas de citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7$). El recubrimiento con citratos ha sido probado como un método eficiente para generar partículas estables dispersadas en agua. En la **Figura 4.6** se muestra una representación de una nanopartícula

recubierta por moléculas de citrato de sodio. Los grupos funcionales del ácido carboxílico pueden unirse fuertemente a las partículas a través de su acción como ligandos multidentados a la vez que garantizan la solubilidad en agua en un amplio intervalo de pH debido a su polaridad y carga.[14] Las cargas negativas de los carboxilatos crean un alto potencial zeta negativo que previene la agregación de las partículas y facilita su atrapamiento óptico.[22]

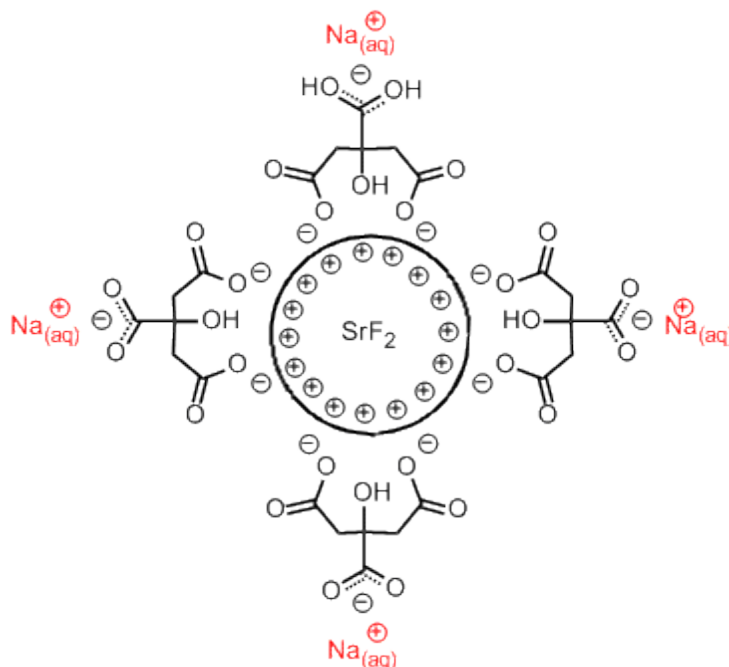


Figura 4.6. Nanopartícula recubierta de moléculas de citrato de sodio. Los ligandos de la superficie periten que la partícula quede establemente dispersa en agua.

A continuación se detallan los pasos a seguir:

- 1- En primer lugar, la cantidad deseada de partículas en polvo se dispersa en 5 ml de hexano.
- 2- Se añade un volumen de una disolución 0.2 M de citrato de sodio (pH 4) a la dispersión de partículas. El volumen de la disolución de citrato de sodio debe ser mayor que el de hexano para facilitar la separación entre las dos fases (acuosa y orgánica).
- 3- La dispersión se agita durante 2 h a 700 rpm. Durante este proceso se separan las dos fases. La fase acuosa contiene las partículas.
- 4- Una vez pasado el tiempo de agitación, se recoge la fase acuosa empleando una pipeta.
- 5- A la dispersión acuosa de nanopartículas se le añade una disolución acuosa de acetona 1:2 (relación agua:acetona). La dispersión se centrifuga a 13000 durante 40 min hasta que las partículas han precipitado.
- 6- Se elimina el sobrenadante y se reemplaza por 5 ml de una disolución de citrato de sodio 0.2 M (pH 7). La dispersión final se agita hasta que las partículas quedan bien dispersas.
- 7- Se añaden 4 mL de acetona (1:5) y se centrifuga la dispersión durante 40 min a 13000 hasta que las partículas precipitan.
- 8- Finalmente se elimina el sobrenadante y las partículas se redispersan en agua.

Procedimiento 3: Variación del valor de potencial zeta de nanopartículas recubiertas de moléculas de citrato.

En los experimentos dedicados al estudio del parámetro dominante en la determinación de las fuerzas ópticas que actúan sobre nanopartículas, se quiso modificar sus propiedades electrostáticas sin variar su tamaño. Se emplearon partículas recubiertas por moléculas de citrato (muestra III) cuyo potencial zeta era de -21 mV. Se añadieron pequeñas cantidades de ácido clorhídrico a la dispersión de partículas con el fin de variar su valor de potencial zeta. Se observó que, a mayor cantidad de ácido, menor era el valor del potencial zeta (ver **Figura 4.7**, arriba). Esta tendencia se basa en que la adición de ácido clorhídrico induce el intercambio de los cationes de sodio (Na^+) presentes en la capa que rodea a la partícula por protones (H^+) (ver **Figura 4.7**, abajo). La incorporación de ácido clorhídrico modifica los parámetros de la capa que rodea a la superficie de la partícula haciendo que el valor de potencial zeta sea más negativo.

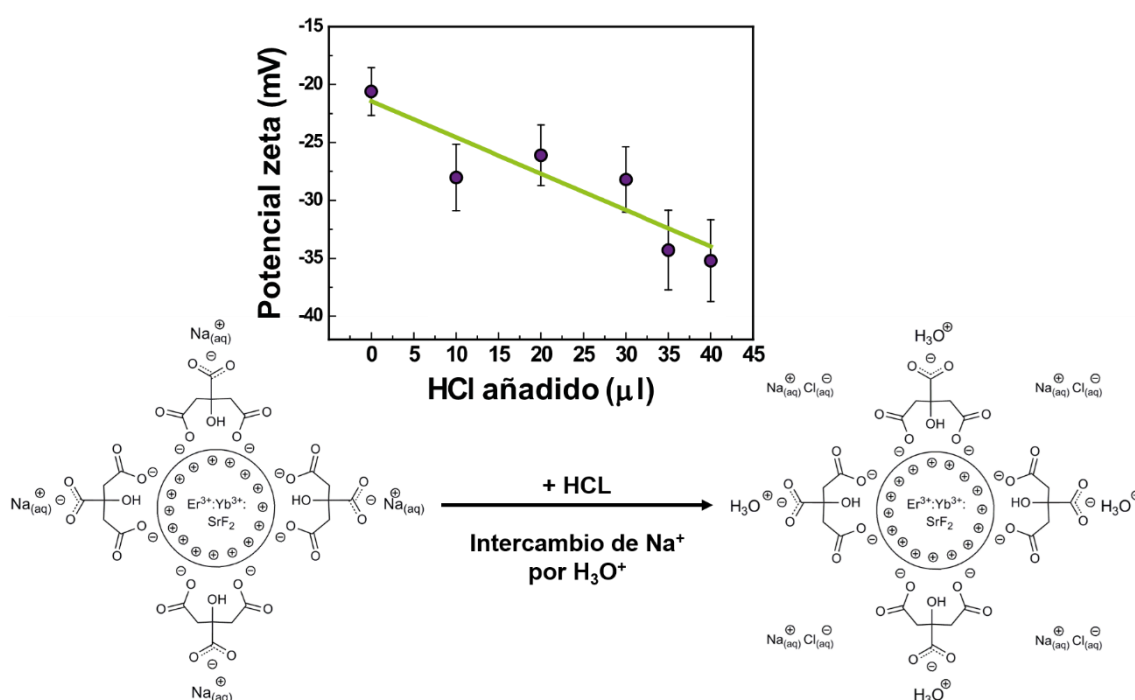


Figura 4.7 Variación del valor de potencial zeta de partículas recubiertas por citratos. *Arriba:* Valor del potencial zeta en función de la cantidad de HCl añadido. *Abajo:* Representación esquemática del intercambio de cationes que tiene lugar en la superficie de la partícula.

4.2- Atrapamiento óptico: montaje experimental y consideraciones importantes.

En esta sección se describen los elementos ópticos necesarios para construir un equipo de pinzas ópticas. Se hace hincapié en los elementos necesarios para implementar los métodos hidrodinámicos y PSD. Además, se analizan las condiciones óptimas de atrapamiento y cómo conseguirlas.

4.2a- Montaje experimental.

En la **Figura 4.8a** se muestra el equipo básico de pinzas ópticas. Como se explicó en el capítulo 1, en este tipo de sistema de atrapamiento óptico únicamente se utiliza un haz láser que se focaliza para crear la trampa óptica. Es importante destacar que un equipo de pinzas ópticas puede estar constituido por más de una trampa óptica (ver más abajo).

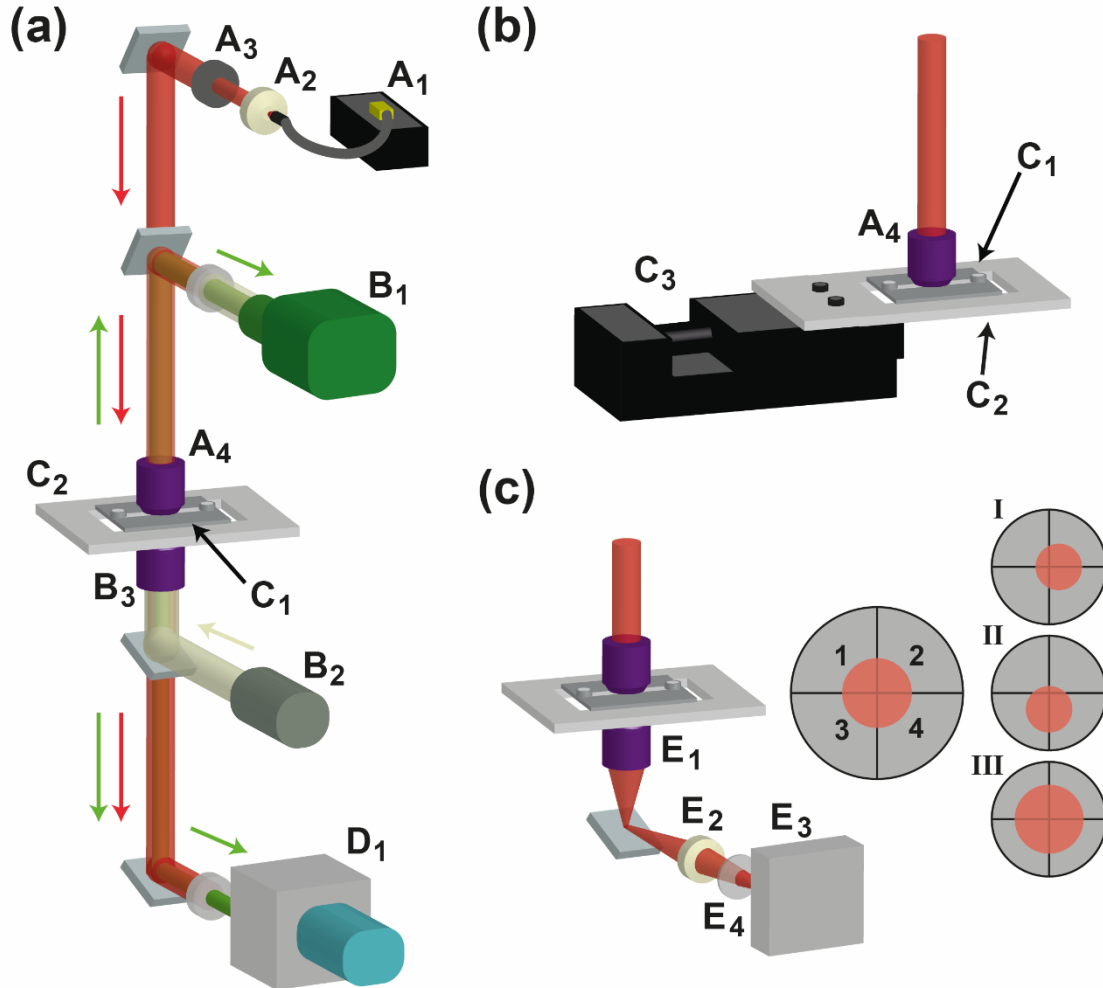


Figura 4.8. Montaje experimental. (a) Diagrama de los distintos elementos que forman el equipo de pinzas ópticas empleado en esta tesis. (b) Modificación del montaje para la implementación de los métodos hidrodinámicos lineales. (c) Modificación del montaje para la implementación del método PSD. El haz láser está representado en color rojo, mientras que la luminiscencia y la luz blanca de iluminación están representadas en verde y blanco, respectivamente. La dirección de propagación de los distintos haces se ha indicado con flechas de los respectivos colores. Los elementos rectangulares y en forma de disco de color gris claro no numerados corresponden a espejos/divisores de haz y filtros, respectivamente.

El equipo experimental básico está destinado al atrapamiento y manipulación de partículas. Sin embargo, se pueden realizar una serie de modificaciones para incorporar nuevas funciones. A continuación se detallan los elementos que componen los distintos módulos que forman el sistema experimental. La numeración de los distintos elementos hace referencia al esquema de la **Figura 4.8**.

Atrapamiento óptico.

Los componentes que forman esta sección son los más importantes a la hora de implementar un equipo de pinzas ópticas.

Fuente láser (A₁).

Durante el desarrollo de esta tesis, se han empleado fundamentalmente láseres de diodo acoplados a fibra monomodo (Lumics) que son compactos, baratos (comparados con otras fuentes láser) y generan suficiente potencia (500 mW) como para permitir el atrapamiento de partículas tanto micrométricas como nanométricas.

La longitud de onda de la radiación láser debe elegirse de tal manera que satisfaga los requerimientos experimentales. Por ejemplo, para el desarrollo de esta tesis doctoral se usaron láseres cuya longitud de onda se encuentra en el infrarrojo cercano. Principalmente se emplearon láseres de 980 nm ya que esta longitud de onda excita de manera muy eficiente la luminiscencia de las partículas que se han estudiado.

La radiación generada por los láseres de diodo empleados está polarizada linealmente. En general la polarización no se mantiene en el tiempo, por lo que se empleó un láser especial de polarización permanente para los estudios destinados a la orientación de partículas atrapadas.

Colimador (A₂).

La radiación que genera la fuente láser ha de ser colimada. Esto puede conseguirse empleando un colimador compacto en el que únicamente hay que acoplar la fibra del láser. Sin embargo, para una mejor colimación de la luz, es preferible construir un colimador que permita acoplar manualmente la fibra a la lente colimadora. Para ello se emplea una lente de distancia focal reducida colocada delante de la salida de la fibra del láser. Ambas, lente y fibra, se colocan en soportes cuya orientación puede controlarse mediante tornillos micrométricos. De esta manera se puede acoplar la fibra a la lente haciendo que el haz que emerja de esta última esté colimado.

Expansor de haz (A₃).

Una vez colimado el haz láser, éste ha de expandirse con el fin de que cubra completamente la apertura trasera del objetivo que se usará para crear la trampa óptica. Eso es necesario para que la apertura numérica real que se emplee sea la del objetivo. Cuando el haz no cubre completamente la apertura trasera (ϕ) del objetivo, se puede obtener un valor de la apertura numérica efectiva (AN_{ef}) mediante:

$$AN_{ef} = \frac{\text{área del haz láser}}{\phi} AN \quad (4.1)$$

Donde AN es la apertura numérica del objetivo empleado. Solamente si el haz cubre completamente la apertura trasera se tiene que $AN_{ef} = AN$. Generalmente, para optimizar la constante de atrapamiento hay que emplear haces cuya área exceda la de la apertura trasera del objetivo. Sin embargo, se han publicado trabajos en los que se demuestra una mejora del atrapamiento óptico cuando no se llena por completo la apertura trasera del objetivo.[23] Esta disparidad de criterio puede explicarse teniendo en cuenta que la

constante de atrapamiento para partículas comparables a la longitud de onda se optimiza si el tamaño de la trampa es del orden del de la partícula (ver sección 2.1c).

Objetivo de microscopio usado para crear la trampa óptica (A₄).

Las características del objetivo usado para la creación de la trampa óptica dependen de las partículas que quieran atraparse. Normalmente se emplean objetivos de inmersión de aceite de alta apertura numérica que permiten una mayor focalización del haz. En la sección 4.2d se hablará en mayor detalle de este aspecto.

Visualización de la muestra.

El sistema experimental empleado consta de una cámara para la adquisición de imágenes y un sistema de iluminación.

Cámara óptica (B₁).

La imagen recogida por el objetivo de atrapamiento se dirige a una cámara óptica que permite ver, en tiempo real, la partícula atrapada. Para una mejor visualización de la región de la trampa se puede usar una lente para magnificar la imagen. Se emplearon tanto una cámara CMOS (Thorlabs) como una cámara CCD (QImaging). Además, se colocaron distintos filtros paso bajo (FGS900 / FES0750, Thorlabs) para bloquear la llegada del láser a la cámara. De esta manera se podía obtener una imagen de la partícula y su luminiscencia sin dañar la cámara.

Las especificaciones técnicas de la cámara empleada deben estar de acuerdo con los requerimientos experimentales. Por ejemplo, para implementar ciertos métodos pasivos (ver sección 2.2b), es necesaria una cámara de alta resolución temporal y espacial.

Iluminación.

En el montaje experimental de la **Figura 4.8a**, la imagen se obtiene en transmisión ya que la iluminación se sitúa en la parte opuesta de la muestra. La luz que genera una lámpara (B₂) es focalizada en la región de la trampa por un objetivo (B₃) de baja apertura numérica. De esta manera se asegura que toda la región de la trampa esté iluminada de manera uniforme. El objetivo está colocado en un soporte que permite su desplazamiento en las tres direcciones del espacio. Este objetivo también se empleó para focalizar un haz láser secundario necesario para los experimentos de termometría y medida de la viscosidad intracelular (sección 5.4 y anexo F).

La implementación de un sistema de toma de imagen es especialmente útil en el caso de partículas que puedan resolverse ópticamente. Sin embargo, este sistema puede emplearse también para la visualización de partículas nanométricas luminiscentes ya que permite detectar la emisión generada por la nanopartícula atrapada. El análisis en tiempo real de la luminiscencia a través de la cámara permite determinar el número de partículas atrapadas. En la **Figura 4.9** se muestra la luminiscencia detectada en la cámara en función del tiempo durante un experimento de atrapamiento óptico. La intensidad permanece constante hasta que una partícula es atrapada. En ese momento tiene lugar un incremento en la luminiscencia total. Las imágenes ópticas de la **Figura 4.9** muestran la intensidad en la región de la trampa al incorporarse secuencialmente 1, 2 y 3 partículas. Monitorizando la luminiscencia total en la trampa se puede determinar el número de

partículas atrapadas. Esta estrategia se empleó en los experimentos de atrapamiento secuencial de nanopartículas (ver sección 5.1b).

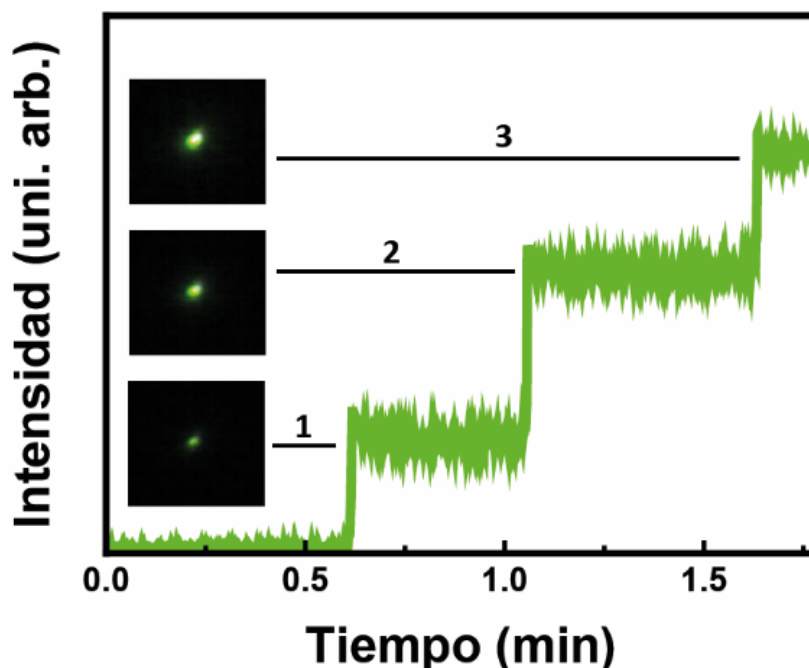


Figura 4.9. *Luminiscencia detectada en la trampa óptica en función del tiempo. La intensidad total detectada permite determinar el número de partículas atrapadas aunque éstas no puedan resolverse ópticamente.*

Soporte de la muestra.

Microcanales (C₁).

Para la realización de los experimentos de atrapamiento óptico, la dispersión de partículas se colocó en el interior de un microcanal (μ -Slide I80106, Ibidi) de 100 o 200 μ m de altura y 50 x 5 mm de área. Los microcanales empleados son transparentes lo que permite la visualización de la muestra en transmisión.

Plataforma (C₂).

La muestra se coloca en una plataforma especialmente diseñada para el soporte de los microcanales cuya posición puede controlarse en las direcciones X e Y con precisión micrométrica. La posición relativa entre el objetivo de atrapamiento y la muestra (dirección Z) se puede controlar con precisión micrométrica tanto manualmente como de manera mecánica empleando un motor controlado por ordenador.

Esta parte del montaje experimental puede ser modificada para distintos usos:

- Se empleó una plataforma calentadora dotada con un peltier (PE120, Linkam) para mantener la muestra a una temperatura constante con una precisión de 0.1 °C. Este montaje se usó en los estudios celulares. La placa calentadora permitió calibrar la dependencia de la emisión de partículas dopadas con iones Er^{3+} con la temperatura (sección 5.4).

- La muestra se colocó sobre una plataforma motorizada (C_3 en **Figura 4.8b**) que permite su desplazamiento respecto a la posición de la trampa óptica a una velocidad controlada en una dirección. Esta modificación es necesaria para poder implementar los métodos hidrodinámicos lineales.
- Los mapas de temperatura se realizaron empleando una plataforma motorizada (PI Hera, PI Instruments) capaz de realizar desplazamientos de $0.1\ \mu\text{m}$ en un área de $250 \times 250\ \mu\text{m}^2$.

Detección de la luminiscencia.

La detección de la luminiscencia se puede realizar tanto en reflexión como en transmisión.

- *Reflexión*: La luminiscencia generada en la región de la rampa se recoge con el mismo objetivo de atrapamiento.
- *Transmisión*: La luminiscencia se recoge empleando el objetivo de iluminación. Este objetivo debe colocarse de tal manera que su foco coincida exactamente con el foco del láser de atrapamiento. Como la luminiscencia sólo se genera en la región de la trampa, se puede emplear un objetivo de baja apertura numérica cuyo foco sea mayor que el tamaño de la trampa.

En ambos casos, la luminiscencia se dirige a un detector (D_1) donde puede ser analizada en tiempo real. En el desarrollo de la tesis se emplearon espectrofotómetros compactos y una cámara CCD de silicio de alta sensibilidad acoplada a un monocromador. Ambos tipos de detector permiten analizar la luz detectada en la región visible e infrarroja cercana. Para más información ver la sección 4.3d.

Múltiples trampas.

El montaje experimental fue modificado con el fin de realizar experimentos de atrapamiento empleando dos trampas ópticas. El procedimiento empleado para generar dos trampas ópticas independientes consiste en dividir el haz de atrapamiento en dos haces que son posteriormente focalizados por un mismo objetivo. En este tipo de sistemas, la potencia total generada por la fuente láser se divide en dos, por lo que cada una de las trampas generadas tendrá la mitad de la potencia total. Como la potencia láser generada por las fuentes láser de 980 nm empleadas en esta tesis no es suficiente como para dar lugar a dos trampas estables (debido a las pérdidas ocasionadas en los diferentes elementos ópticos), se empleó una segunda fuente láser de mayor potencia (y longitud de onda de 1060 nm) en combinación con la primera. De esta manera cada trampa está compuesta por radiación láser procedente de dos fuentes distintas. La potencia de ambas permite el atrapamiento óptico de la partícula, pero solo la de longitud de onda de 980 nm excita eficientemente su luminiscencia.

En la **Figura 4.10** se muestra un esquema de la modificación introducida en el montaje experimental. En primer lugar, los dos haces, el de longitud de onda de 980 nm y el de 1060 nm, se superponen empleando un divisor de haz (D_1). Este haz es entonces dirigido a un segundo divisor de haz (D_2) que lo divide en dos. Los haces secundarios generados son dirigidos a sendos espejos (E_1 y E_2) en los que son reflejados de vuelta al divisor de haz D_2 que los superpone de nuevo en la misma dirección. Cada uno de los haces da lugar a una trampa óptica al ser focalizado por el objetivo de atrapamiento. Cambiando el

alineamiento de los espejos se puede generar una pequeña diferencia angular entre la dirección de propagación de los haces. De esta manera, la posición de cada una de las trampas se controla mediante los espejos E_1 y E_2 .

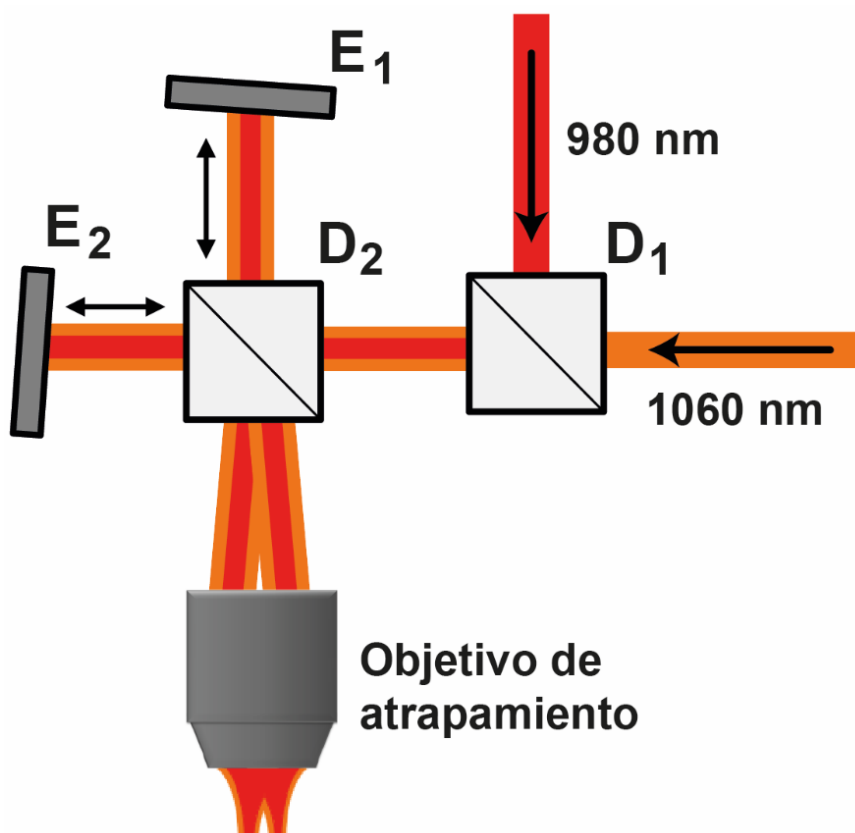


Figura 4.10. Modificación del sistema experimental para la generación de dos trampas ópticas. Los elementos ópticos empleados son dos divisores de haz (D_i) y dos espejos (E_i).

Esta modificación del sistema de atrapamiento permite generar dos trampas, cada una de ellas compuesta por radiación de longitud de onda de 980 y 1060 nm. La potencia total de cada trampa será la suma de la potencia de cada una de las radiaciones láser que la componen. En los experimentos de manipulación óptica de partículas cilíndricas (sección 5.2a) se obtuvo una potencia láser en cada una de las trampas de 80 mW.

4.2b- Determinación de la posición de la partícula.

Algunos métodos de calibración de la trampa se basan en la medida de la posición del objeto atrapado (ver sección 2.2), por lo que requieren una correcta calibración en posición del sistema experimental. La determinación de la posición de la partícula puede realizarse mediante la obtención de imágenes ópticas o por un método alternativo. Ambos casos se explican a continuación.

Posición basada en la adquisición de imágenes ópticas.

En este caso, se necesita un sistema de imagen con una alta resolución espacial, del orden de cientos de nanómetros por pixel.[24] La calibración puede obtenerse de la adquisición de imágenes de un objeto de tamaño conocido. Posteriormente se obtiene la posición de la partícula empleando algoritmos capaces de determinar el centroide de la partícula.[25]

Método basado en la dispersión del láser de atrapamiento.

Se puede medir la posición de la partícula atrapada analizando el haz de atrapamiento que dispersado por ésta.[25, 26] Para ello se puede emplear un fotodiodo de cuadrantes (*Quadrant photodiode*, QPD). La luz dispersada por la partícula es detectada por el QPD, de cuya señal eléctrica se puede obtener el desplazamiento relativo entre la partícula y el centro de la trampa. En el caso de partículas grandes (micrométricas), la posición se mide a través del desplazamiento que sufre el haz cuando la partícula no se encuentra en el centro de la trampa.[27] Cuando la partícula es pequeña (nanométrica), su posición se determina mediante la denominada interferometría de plano focal trasero (*back focal plane interferometry*).[28] En este caso, se analiza la interferencia generada entre la luz dispersada y no dispersada por la partícula.

El método PSD se basa en estos procedimientos para determinar la constante de atrapamiento. En la **Figura 4.8c** se muestra un esquema del módulo de detección con todos los elementos necesarios. El condensador (E_1) recoge el láser dispersado por la partícula atrapada. La lente (E_2) focaliza la imagen de plano focal del condensador en el QPD (E_3). También se añade un filtro (E_4) para disminuir la intensidad de la luz que llega al detector y evitar su saturación.

El QPD está compuesto por un fotodiodo de 4 cuadrantes (ver **Figura 4.8c**, derecha). La señal que recibe cada uno de ellos es convertida en un voltaje (V_1, V_2, V_3, V_4). La suma de esas señales es proporcional a la posición de la partícula:

$$\text{Coordenada X: } V_X = (V_1 + V_4) - (V_2 + V_3) \quad (4.2)$$

$$\text{Coordenada Y: } V_Y = (V_3 + V_4) - (V_1 + V_2) \quad (4.3)$$

$$\text{Coordenada Z: } V_Z = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 \quad (4.4)$$

4.2c- Coeficiente de rozamiento.

El coeficiente de rozamiento de la partícula con el fluido que la rodea es un parámetro importante a la hora de realizar experimentos de atrapamiento óptico. No solamente es necesario conocer su valor para poder calibrar la constante de atrapamiento, sino que también influye en la manipulación óptica. Por ejemplo, los medios donde se dé un alto coeficiente de rozamiento, tal como el interior celular, dificultarán la manipulación del objeto atrapado.

Existen diferentes coeficientes de rozamiento dependiendo del tipo de movimiento que realice la partícula. Si ésta se desplaza en el interior del fluido, hay que tener en cuenta el coeficiente de rozamiento de traslación. Sin embargo, si la partícula se encuentra rotando en una posición fija, es el coeficiente de rozamiento de rotación el que determina cómo afecta el medio al movimiento de la partícula. En ambos casos, el coeficiente de rozamiento depende tanto de la geometría de la partícula como de la viscosidad dinámica del medio (η). En la **Tabla 4.1** se recogen los coeficientes de rozamiento (β) para distintas geometrías de partícula.[29-31] Se puede ver como β cambia dependiendo de la forma de la partícula. En algunas ocasiones, no existe una expresión analítica que lo describa. En esos casos se puede hacer una aproximación empleando la expresión para la partícula esférica en la que se introduce el radio hidrodinámico de la partícula. Si éste no puede

medirse de manera adecuada, como es el caso de partículas del orden de micras, se puede emplear otra aproximación. En este caso se calcula el radio efectivo de la esfera equivalente cuya superficie es la misma que la de la partícula.

| Geometría | β traslación | β rotación |
|-----------|--------------------------------------|--------------------|
| Esfera | $\frac{3}{2} \eta \frac{A}{R}$ | $8 \eta V$ |
| Cilindro | $2\pi \eta \frac{L}{\ln(L/R) - 1/2}$ | --- |
| Disco | --- | $6 \eta V^f / f_0$ |

Tabla 4.1. Coeficientes de rozamiento para distintas geometrías de partícula. A , R , L y V son el área, el radio, la longitud y el volumen de la partícula, respectivamente. El factor f/f_0 es el coeficiente de fricción de Perrin.[30]

Los coeficientes de rozamiento mostrados en la **Tabla 4.1** únicamente son válidos cuando las partículas se mueven dentro del fluido lejos de las paredes del recipiente que contiene la dispersión. La existencia de paredes cercanas hace que el coeficiente de rozamiento aumente.[31] Este efecto es apreciable cuando la distancia con las paredes es comparable al radio de la partícula.[32] En estos casos, el coeficiente de rozamiento debe corregirse por un factor que depende del radio de la partícula y su distancia a la superficie (d). Para el caso de una partícula moviéndose paralelamente a la superficie:

$$\beta_{sup} = \frac{\beta}{1 - \frac{9}{16} \left(\frac{R}{d}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{R}{d}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{R}{d}\right)^4 + \frac{1}{16} \left(\frac{R}{d}\right)^5} \quad (4.5)$$

El factor de corrección debe tenerse en cuenta a la hora de estimar la fuerza de atrapamiento mediante los métodos hidrodinámicos y de PSD.

4.2d- Condiciones óptimas de atrapamiento.

Como se vio en el capítulo 2, las condiciones de atrapamiento vienen determinadas fundamentalmente por el tamaño de la partícula. En general, cuanto mayor es el volumen de la partícula, mayor es la fuerza óptica que puede ejercerse sobre ella. Sin embargo, existen ciertos factores experimentales que hay que tener en cuenta con el fin de obtener las condiciones óptimas de atrapamiento en cada experimento.

Tamaño de la trampa.

Para el atrapamiento de nanopartículas es necesario un tamaño de trampa reducido. En esta tesis se atraparon nanopartículas de 8 nm de diámetro empleando una trampa óptica de 360 nm de radio. Al reducir el tamaño de la trampa se consigue crear un gradiente óptico suficientemente alto como para sobrepasar las fluctuaciones térmicas. El radio de la trampa óptica (i.e. el radio del spot láser, w_0) puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$w_0 = \frac{2}{\pi} \frac{\lambda_0}{AN n_m} \quad (4.6)$$

Se puede ver cómo tanto la apertura numérica como la longitud de onda de atrapamiento juegan un papel importante. Cuanto menor sea la longitud de onda y mayor la apertura numérica, menor será el tamaño de la trampa. Por esta razón se emplean objetivos de inmersión de aceite de alta apertura numérica para atrapar partículas nanométricas.

Para el caso de partículas cuyo tamaño es comparable con la longitud de onda de atrapamiento, es conveniente emplear objetivos que permitan conseguir un tamaño de trampa óptica del orden del de la partícula.[33-36]

Intensidad de potencia.

La fuerza óptica escala con la intensidad de potencia, por lo que para alcanzar mayores fuerzas ópticas es necesario emplear altas intensidades de potencia. Éstas se pueden conseguir aumentando la apertura numérica del objetivo (i.e. reduciendo el tamaño de la trampa). Según los resultados experimentales derivados de esta tesis, la intensidad de potencia mínima necesaria para poder atrapar nanopartículas dieléctricas es del orden de 10 MW/cm^2 (partículas de 8 nm de diámetro y objetivo de 1.4 AN), mientras que para el caso de micropartículas es de 1 MW/cm^2 (partícula de 3 μm de diámetro y objetivo de 0.55 AN).

Valor de potencial zeta.

Cuando una partícula se introduce en un fluido, las moléculas del disolvente y los iones disueltos en él se distribuyen alrededor de ésta. Por esta razón, incluso las partículas desnudas (sin recubrimiento) presentan una “nube de carga” a su alrededor que puede describirse empleando la aproximación denominada capa eléctrica doble (*electric double layer*, EDL).[37] Ésta establece que la nube de carga está formada por dos capas. La más próxima a la superficie de la partícula está compuesta por cargas fuertemente unidas a ella cuyo signo es contrario a las de la partícula. Por otro lado, la capa externa está formada por cargas que son atraídas por acción de la fuerza de Coulomb, pero que pueden entrar y salir de ésta gracias a las fuerzas térmicas y a los gradientes de concentración. A pesar de esto, estas cargas se mueven junto con la partícula cuando esta se desplaza, ya que existe un balance entre las fuerzas de Coulomb y la difusión. Para caracterizar esta doble capa que rodea a la partícula se emplea el potencial zeta, que está definido como el potencial en el plano que delimita la capa externa y la separa del disolvente. El potencial zeta puede emplearse para calcular la carga superficial neta ($|\sigma|$) de la partícula a través de la expresión:[38]

$$|\sigma| = \frac{2\varepsilon_m \varepsilon_0 d_\lambda k_B T}{e} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2E_r}\right) \quad (4.7)$$

Donde ζ representa el potencial zeta, e es la carga del electrón y d_λ es la longitud de Debye, que determina la distancia, respecto a la capa interna, a la que el potencial eléctrico de la partícula ha decrecido en $1/e$. E_r es una energía de referencia que representa la energía electrostática mínima que permite que se forme una doble capa estable. En una primera aproximación, puede asumirse que esta energía es igual a la energía térmica cuyo valor a temperatura ambiente es $E_r \approx k_B T = 25e \text{ mV}$. La expresión 4.7 se obtiene al

integrar la densidad de carga en la doble capa y hacer que su magnitud sea igual a la carga neta superficial de la partícula, de tal manera que se satisfaga la condición de neutralidad de carga en el sistema. De esta manera, la expresión 4.7 relaciona el potencial zeta con las características electrostáticas de la partícula, las que a su vez determinan la polarizabilidad de ésta.

En el caso de nanopartículas, la fuerza óptica escala con la polarizabilidad (expresión 2.9), de tal manera que, al aumentar el valor absoluto de su potencial zeta, la fuerza óptica también lo hace. Este aspecto se analizará en la sección 5.3. Los resultados publicados para micopartículas establecen que, cuando el tamaño de la partícula aumenta, el efecto del potencial zeta sobre la polarizabilidad disminuye en favor del volumen, que será el parámetro predominante en la determinación del valor de la fuerza óptica en esa escala de tamaños.

4.3- Caracterización básica.

En esta sección se describen las diferentes técnicas empleadas en esta tesis para la caracterización de las partículas estudiadas. Se incluye el procedimiento seguido para la preparación de las muestras y los instrumentos empleados.

4.3a- Microscopía electrónica.

Se realizaron medidas de microscopía electrónica tanto de transmisión como de barrido para determinar el tamaño de las partículas. Una vez obtenidas las imágenes, se midieron las diferentes dimensiones (radio, grosor, largo) de las partículas utilizando el programa *ImageJ* y se calcularon las dimensiones medias.

Preparación de la muestra.

Para la realización de las medidas de microscopía electrónica de barrido, la dispersión de partículas fue depositada en un soporte de grafito y dejada secar durante 24 h en una estufa a 60 °C. Posteriormente, la muestra fue recubierta con oro empleando la técnica *sputter* (Q150T-S).

En el caso de la caracterización por microscopía electrónica de transmisión, las dispersiones de partículas fueron depositadas sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y dejadas secar a temperatura ambiente.

Equipo.

Las medidas de microscopía de barrido se realizaron en el servicio de Microscopía Electrónica del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad autónoma de Madrid. El equipo empleado fue un microscopio electrónico de Barrido (Hitachi S-3000N).

Las medidas de microscopía electrónica de transmisión se realizaron con un Microscopio electrónico de transmisión (JEM1010, Jeol) perteneciente al servicio de Microscopía Electrónica de Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

4.3b- Radio hidrodinámico y potencial zeta.

Preparación de la muestra.

La concentración de las dispersiones estudiadas se ajustó en el momento de la realización del experimento con el fin de obtener medidas de buena calidad. Las muestras fueron introducidas en cubetas especiales para las medidas de DLS (*dynamic light scattering*) y potencial zeta.

Equipo.

Las medidas tanto de tamaño hidrodinámico como potencial zeta se realizaron en un instrumento DLS (Nano-ZS, Malvern) perteneciente al Instituto IMDEA Nanociencia.

4.3c- Espectroscopía de extinción.

Preparación de la muestra.

A causa de la baja absorción que presentaban las partículas estudiadas debido a la baja concentración de iones dopantes, los experimentos de espectroscopía de absorción se realizaron empleando disoluciones de partículas muy concentradas ($> 10^{16}$ partículas/cm³).

Equipo.

Se realizaron medidas del coeficiente de extinción de las muestras empleando un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 1050) equipado con un fotomultiplicador para la detección en el intervalo espectral 200-860 nm, un detector de InGaAs refrigerado para el intervalo 860 - 1800 nm y un detector PbS refrigerado para el intervalo 1800 - 3300 nm.

4.3d- Espectroscopía de emisión.

Preparación de la muestra.

Se estudió la luminiscencia de partículas aisladas depositadas y en dispersión. Se prepararon dispersiones acuosas diluidas ($< 10^{11}$ partículas/cm³) que fueron agitadas empleando un baño de ultrasonidos (VWR) antes de cada experimento para prevenir que las partículas se aglomerasen.

Para el estudio de partículas depositadas, alícuotas de la dispersión fueron secadas sobre un portaobjetos previamente calentado a más de 60 °C. De esta manera se consigue depositar una capa de partículas dispersas evitando que se aglomeren debido a la tensión superficial del agua. Para los experimentos de espectroscopía en condiciones atrapamiento óptico, la dispersión de partículas se introdujo dentro de un microcanal. Para más información sobre los experimentos de atrapamiento ver sección 4.3f.

Equipo.

El equipo empleado, tanto para el análisis de partícula depositadas como en dispersión, se encuentra descrito en la sección 4.2a. Se realizaron medidas espectroscópicas para

determinar la luminiscencia de la dispersión de partículas así como de una única partícula. En el primer caso se emplearon objetivos de apertura numérica baja (ej. 10x, 0.10 AN) con el fin de recoger la luminiscencia de un conjunto amplio de partículas. En el segundo caso, se emplearon objetivos de mayor apertura numérica para poder excitar únicamente a la partícula depositada o atrapada. La apertura numérica empleada depende del tamaño de la partícula. Para más información ver sección 4.2d.

Se emplearon espectrofotómetros compactos (USB2000+, Ocean Optics) y una cámara CCD de silicio de alta sensibilidad (Synapse, Horiba) acoplada a un monocromador (iH320, Horiba). Ambos tipos de detectores permiten medir y analizar la emisión de la partícula en el intervalo 350 - 1100 nm. Se emplearon filtros de paso bajo (FGS900 / FESH0750 / FESH0950, Thorlabs) para bloquear la llegada de señal procedente del láser al detector.

Para determinar la dependencia del espectro de emisión con el ángulo de polarización, se realizó una modificación del sistema experimental presentado en la **Figura 4.8a**. Se colocó un polarizador lineal (LPNIR050-MP2, Thorlabs) en una montura giratoria a la entrada del detector. La montura permitía rotar el polarizador para seleccionar el ángulo de polarización con una precisión de 2°.

4.3e- Espectroscopía multifotónica.

Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra está descrita en la sección 4.4b donde se detallan los procedimientos de cultivo e incubación de células.

Equipo.

Para la caracterización de la internalización de los cilindros de oro en células HeLa empleadas en los experimentos de fototerapia, se empleó un microscopio Zeiss LSM 710 perteneciente al servicio de Microscopía Óptica y Confocal de Centro de Biología molecular Severo Ochoa.

4.3f- Atrapamiento óptico.

Preparación de la muestra.

En todos los experimentos realizados se emplearon dispersiones acuosas de las partículas. La concentración de las muestras se disminuyó de tal manera que el número de partículas por centímetro cúbico permitiera poder mantener una única partícula en la trampa el mayor tiempo posible (tiempos del orden de minutos). En general se emplearon concentraciones del orden de 10^9 partículas/cm³ o menores.

Antes de cada experimento, la dispersión de partículas fue agitada durante varios minutos empleando un baño de ultrasonidos. Todos los experimentos de atrapamiento óptico se realizaron empleando microcanales donde la muestra era inyectada (ver sección 4.2a, soporte de la muestra).

Equipo.

El equipo que se empleó está descrito en la sección 4.2a. En todos los experimentos se monitorizó la imagen o la luminiscencia detectada en la región de la trampa con el fin de determinar el número de partículas atrapadas. Se emplearon diferentes elementos ópticos (ej. Filtros, polarizadores, espejos) dependiendo de la muestra estudiada y el experimento realizado. Las especificaciones individuales para cada tipo de experimento están descritas en el capítulo 5.

4.4- Medidas celulares

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron estudios *in vitro*, utilizando exclusivamente la línea celular tumoral humana HeLa (ATCC® CCL-2™; cáncer de cervix humano). A continuación se detallan los diferentes protocolos seguidos para el cultivo de las células.

4.4a- Cultivos celulares para microreometría.

Las células HeLa fueron crecidas formando una monocapa empleando el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con un 10 % de suero bovino, 50 unidades por mililitro de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina (medio completo). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. El medio se cambió diariamente.

Las células se sembraron en placas de cultivo circulares estériles 48 horas antes de la realización del experimento. Posteriormente, fueron incubadas a 37 °C o 4 °C (dependiendo del experimento a realizar) durante 2 h en una dispersión diluida de partículas (1.1×10^6 partículas/cm³) en medio completo. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron tres veces con una solución salina amortiguada con fosfato (*Phosphate-buffered saline*, PBS) quedando preparadas para los experimentos de microreometría que se detallan en la sección 5.5.

4.4b- Cultivos celulares para tratamiento fototérmico.

Al igual que en el protocolo anterior, las células HeLa fueron crecidas formando una monocapa empleando el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con un 10 % de suero bovino, 50 unidades por mililitro de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina (medio completo). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. El medio se cambió diariamente.

Para llevar a cabo los ensayos de fototermia, las células HeLa fueron sembradas sobre placas de cultivo circulares y se incubaron durante 2 horas con una dispersión de nanopartículas de oro (Nanopartz) en medio completo. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron en una disolución al 3.5 % de formaldehído en PBS durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas de nuevo tres veces con PBS, para posteriormente pasar a ser analizadas mediante microscopía multifotónica (sección 4.3e y anexo D) o empleadas en los experimentos de termometría (sección 5.5).

4.5- Referencias.

1. J. Eastoe, et al., *Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **128–130**: p. 5.
2. M. P. Pileni, *Reverse micelles as microreactors*. The Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**(27): p. 6961.
3. S.-N. Shan, et al., *Synthesis of NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ upconversion nanoparticles in normal microemulsions*. Nanoscale Research Letters, 2011. **6**(1): p. 539.
4. T. V. Gavrilović, et al., *Multifunctional Eu³⁺- and Er³⁺/Yb³⁺-doped GdVO₄ nanoparticles synthesized by reverse micelle method*. Scientific Reports, 2014. **4**: p. 4209.
5. L. P. Qian, et al., *Gold decorated NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄/silica (core/shell/shell) upconversion nanoparticles for photothermal destruction of BE(2)-C neuroblastoma cells*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(2): p. 499.
6. J.-N. Liu, et al., *Silica Coated Upconversion Nanoparticles: A Versatile Platform for the Development of Efficient Theranostics*. Accounts of Chemical Research, 2015. **48**(7): p. 1797.
7. S.-Y. Chang, et al., *Preparation and Properties of Tailored Morphology, Monodisperse Colloidal Silica-Cadmium Sulfide Nanocomposites*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(15): p. 6739.
8. W. Stöber, et al., *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 62.
9. M. Yoshimura and K. Byrappa, *Hydrothermal processing of materials: past, present and future*. Journal of Materials Science, 2008. **43**(7): p. 2085.
10. G. Demazeau, *Solvothermal reactions: an original route for the synthesis of novel materials*. Journal of Materials Science, 2008. **43**(7): p. 2104.
11. G. Demazeau, *Solvothermal Processes: Definition, Key Factors Governing the Involved Chemical Reactions and New Trends*, in *Zeitschrift für Naturforschung B* 2010. p. 999.
12. F. Wang, et al., *Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1061.
13. M. Pedroni, et al., *Water (H₂O and D₂O) Dispersible NIR-to-NIR Upconverting Yb³⁺/Tm³⁺ Doped MF₂ (M = Ca, Sr) Colloids: Influence of the Host Crystal*. Crystal Growth & Design, 2013. **13**(11): p. 4906.
14. N.-N. Dong, et al., *NIR-to-NIR Two-Photon Excited CaF₂:Tm³⁺,Yb³⁺ Nanoparticles: Multifunctional Nanoprobes for Highly Penetrating Fluorescence Bio-Imaging*. ACS Nano, 2011. **5**(11): p. 8665.
15. D. Wawrzynczyk, et al., *Microwave-assisted synthesis and single particle spectroscopy of infrared down- and visible up-conversion in Er³⁺ and Yb³⁺ co-doped fluoride nanowires*. Journal of Materials Chemistry C, 2015. **3**(20): p. 5332.
16. N. Bogdan, et al., *Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles*. Nano Letters, 2011. **11**(2): p. 835.
17. H. Chang, et al., *Rare Earth Ion-Doped Upconversion Nanocrystals: Synthesis and Surface Modification*. Nanomaterials, 2015. **5**(1): p. 1.
18. T. Rinkel, et al., *Synthesis of 10 nm β-NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄ Core/Shell Upconversion Nanocrystals with 5 nm Particle Cores*. Angewandte Chemie International Edition, 2016. **55**(3): p. 1164.
19. K. A. Abel, et al., *Hard Proof of the NaYF₄/NaGdF₄ Nanocrystal Core/Shell Structure*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(41): p. 14644.
20. K. Huang, et al., *Lutetium doping for making big core and core-shell upconversion nanoparticles*. Journal of Materials Chemistry C, 2015. **3**(39): p. 10267.
21. G. Chen, et al., *Core/Shell NaGdF₄:Nd³⁺/NaGdF₄ Nanocrystals with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Downconversion Photoluminescence for Bioimaging Applications*. ACS Nano, 2012. **6**(4): p. 2969.
22. H. Rodríguez-Rodríguez, et al., *Enhancing Optical Forces on Fluorescent Up-Converting Nanoparticles by Surface Charge Tailoring*. Small, 2015. **11**(13): p. 1555.
23. M. Mahamdeh, et al., *Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers*. Optics Express, 2011. **19**(12): p. 11759.

24. M. Sarshar, et al., *Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers*. Journal of Biomedical Optics, 2014. **19**(11).
25. K. C. Neuman and S. M. Block, *Optical trapping*. Review of Scientific Instruments, 2004. **75**(9): p. 2787.
26. T. T. Perkins, *Optical traps for single molecule biophysics: a primer*. Laser & Photonics Reviews, 2009. **3**(1-2): p. 203.
27. R. W. Bowman and M. J. Padgett, *Optical trapping and binding*. Reports on Progress in Physics, 2013. **76**(2).
28. F. Gittes and C. F. Schmidt, *Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers*. Optics Letters, 1998. **23**(1): p. 7.
29. W. Gao, et al., *Highly Efficient Catalytic Microengines: Template Electrosynthesis of Polyaniline/Platinum Microtubes*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(31): p. 11862.
30. R. M. Erb, et al., *Non-linear alignment dynamics in suspensions of platelets under rotating magnetic fields*. Soft Matter, 2012. **8**(29): p. 7604.
31. J. Leach, et al., *Comparison of Faxen's correction for a microsphere translating or rotating near a surface*. Physical Review E, 2009. **79**(2).
32. K. Svoboda and S. M. Block, *Biological applications of optical forces*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994. **23**: p. 247.
33. P. Rodríguez-Sevilla, et al., *Thermal Scanning at the Cellular Level by an Optically Trapped Upconverting Fluorescent Particle*. Advanced Materials, 2016. **28**(12): p. 2421.
34. A. Rohrbach, *Stiffness of Optical Traps: Quantitative Agreement between Experiment and Electromagnetic Theory*. Physical Review Letters, 2005. **95**(16): p. 168102.
35. W. H. Wright, et al., *Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers*. Applied Optics, 1994. **33**(9): p. 1735.
36. B. Paul and H. Stuart, *Three-dimensional force calibration of a single-beam optical gradient trap*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2002. **14**(33): p. 7757.
37. S. Bhattacharjee, *DLS and zeta potential - What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 2016. **235**: p. 337.
38. G. Kokot, et al., *Measured electrical charge of SiO₂ in polar and nonpolar media*. The Journal of Chemical Physics, 2016. **145**(19): p. 194701.

CAPÍTULO 5: Resultados.

En este capítulo se van a presentar los resultados derivados de los distintos estudios realizados durante esta tesis. En primer lugar se describen los experimentos destinados a la caracterización de las partículas empleadas incluyendo un análisis del proceso de *upconversion* de partículas micrométricas de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$, el estudio de la emisión de nanopartículas ópticamente aisladas y los resultados obtenidos de la microscopía luminiscente polarizada.

Posteriormente, se presentan los experimentos destinados a la caracterización del atrapamiento óptico de las partículas. Se estudió tanto la orientación de partículas en el interior de la trampa como los parámetros que determinan la fuerza óptica ejercida sobre éstas.

Una vez caracterizadas las partículas y su atrapamiento óptico, se demostró su aplicación en experimentos *in vitro*, tales como la medida de gradientes térmicos a nivel celular y la medida de la viscosidad intracelular.

5.1- Caracterización de partículas individuales.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en el análisis de la emisión de partículas aisladas. Este tipo de estudios previos son muy importantes para los experimentos de atrapamiento óptico en los que es necesario un conocimiento preciso de las características luminiscentes de la partícula atrapada.

En primer lugar, se detallan los experimentos realizados para la caracterización del proceso de *upconversion* que tiene lugar en partículas micrométricas. Posteriormente, se analiza la emisión de una nanopartícula ópticamente aislada. Por último, se presentan los experimentos de luminiscencia polarizada realizados sobre partículas micrométricas de diferente geometría.

5.1a- Proceso de *upconversion* en una micropartícula de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$.

Se estudió el proceso de *upconversion* producido en micropartículas en forma de disco hexagonal de NaYF_4 dopadas con un 5% de Yb^{3+} y un 0.5% de Er^{3+} (muestra II) cuando son excitadas con radiación de longitud de onda de 980 nm. Las partículas tienen un diámetro medio de 3 μm y un grosor de 1.6 μm . Para poder caracterizar de manera adecuada el proceso de *upconversion* sin saturar el sistema deben emplearse intensidades de potencia reducidas cuya magnitud dependerá de las propiedades de la partícula. Por ejemplo, para nanopartículas es necesario reducir la potencia a decenas de vatios por centímetro cuadrado. Sin embargo, para micropartículas se pueden emplear intensidades de potencia del orden de kilovatios por centímetro cuadrado.[1, 2] Se colocaron diferentes filtros neutros a la salida del láser de excitación para así poder reducir la potencia que alcanzaba la muestra. La luminiscencia fue excitada en tres regímenes de intensidad de potencia: baja ($< 6 \text{ KW}/\text{cm}^2$), media (7-600 KW/cm^2) y alta ($> 600 \text{ KW}/\text{cm}^2$). En el intervalo de baja potencia, el atrapamiento óptico no era suficientemente estable como para mantener la partícula atrapada por lo que se emplearon partículas depositadas en un sustrato transparente. Sin embargo, en los regímenes de media y baja potencia se emplearon partículas ópticamente atrapadas.

Resultados.

Curvas I-P.

Se estudiaron la denominada banda roja del erbio (centrada en torno a 660 nm, $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) y las dos bandas de emisión pertenecientes a la emisión verde (centradas en torno a 525, $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, y 550 nm, $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) del mismo ion. En la **Figura 5.1a** se muestra, en escala logarítmica, la evolución de la intensidad total emitida en esas bandas en función de la intensidad de bombeo para el régimen de baja potencia. Los valores de las pendientes obtenidas se encuentran entre 1 y 2. Al aumentar la intensidad de excitación, las curvas I-P medidas cambiaron sus tendencias. En el intervalo de potencia media se obtuvieron valores de pendiente cercanos a 1. Al aumentar aún más la intensidad de potencia de excitación, la intensidad de emisión comienza a ser independiente de la potencia aplicada y se obtienen pendientes menores que 1 para las tres bandas.

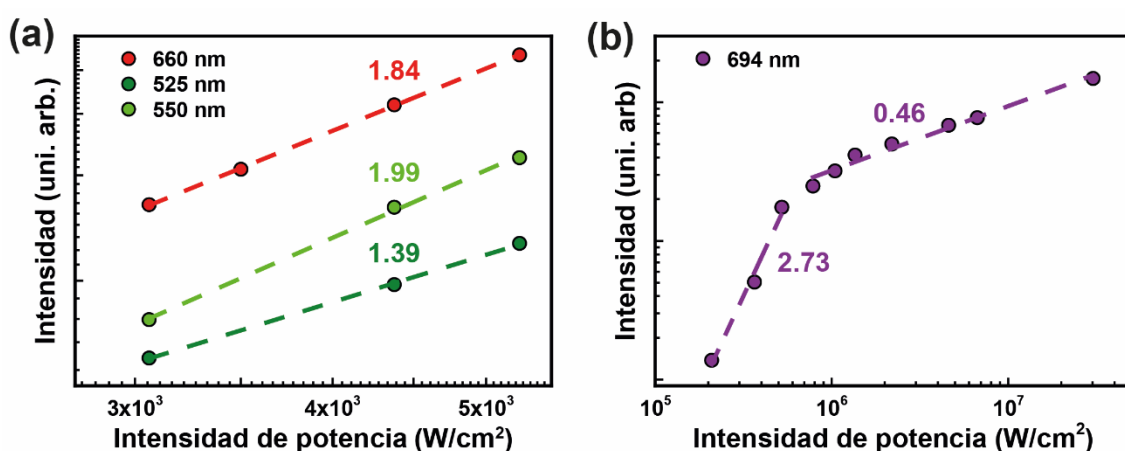


Figura 5.1 Curvas I-P. (a) Intensidad de emisión para las bandas del rojo y el verde en función de la intensidad de excitación para el régimen de baja intensidad de potencia. (b) Intensidad de emisión para la banda de 694 nm (testigo de la emisión morada) en función de la intensidad de excitación para los regímenes de media y alta intensidad de potencia.

Debido a las complicaciones experimentales, la banda de emisión morada centrada en torno a 410 nm ($^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) no pudo ser estudiada de manera adecuada. Sin embargo, se empleó la banda de emisión centrada en torno a 694 nm para analizar el proceso de *upconversion* a tres fotones. Esta banda corresponde a la transición $^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$, por lo que el comportamiento con la potencia de la emisión morada debe ser el mismo que el de la banda centrada en 694 nm y puede emplearse esta última para estudiar el proceso a tres fotones. En el régimen de baja potencia esta banda no es apreciable. Sin embargo, en los intervalos de media y alta potencia su emisión es mucho más intensa y, al situarse cerca de la banda del rojo, es más fácil su caracterización. La pendiente de la curva I-P medida para el intervalo de media intensidad de potencia es de 2.73, mientras que a alta intensidad de potencia decae a 0.46 (ver **Figura 5.1b**).

Transición al régimen de alta potencia.

El paso al régimen de alta potencia hace que la emisión sature completamente y se vuelva independiente de la intensidad de excitación. Se observó que el paso a este régimen de

saturación queda caracterizado por el cociente de intensidades de los picos 540 y 557 nm (I_{540}/I_{557}) de la emisión verde ($^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$). En la **Figura 5.2** se ha representado la intensidad de emisión de la banda centrada en torno a 550 nm (eje de la izquierda y puntos verdes) en función de la intensidad de excitación para los regímenes de media y alta potencia (este último sombreado en morado). Se puede ver claramente el cambio que se produce en la pendiente en la transición de un régimen al otro. También se ha incluido el cociente de intensidades I_{540}/I_{557} (eje de la derecha y puntos negros). Cuando la intensidad del pico a 557 nm supera la del de 540 nm (cociente menor que 1), la emisión satura.

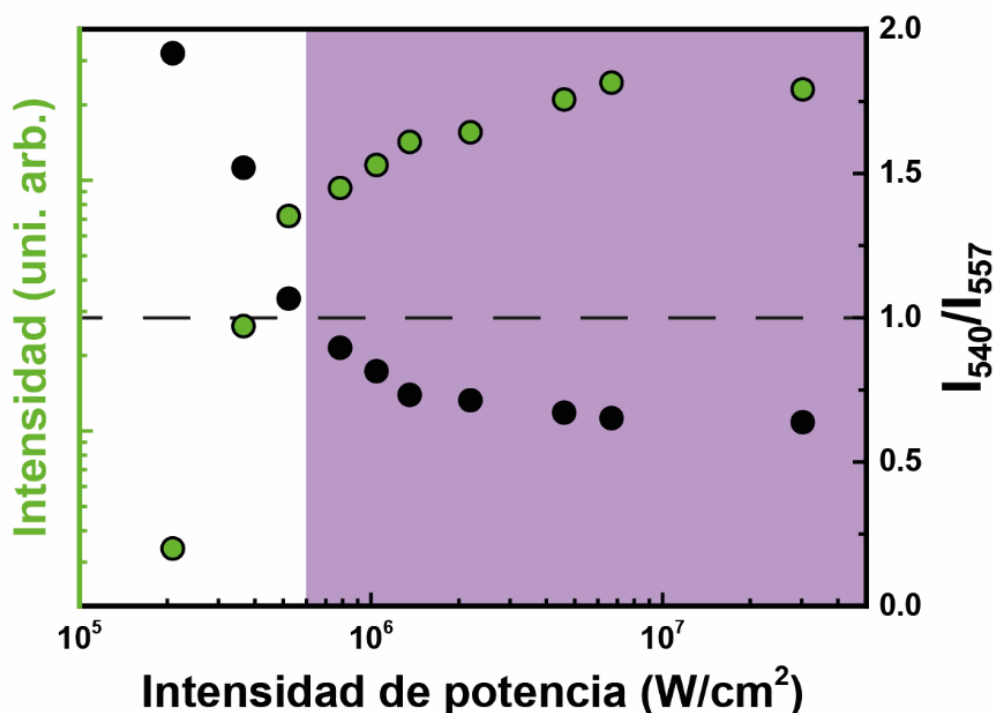


Figura 5.2 Paso al régimen de saturación. Se representan la intensidad de emisión de la banda centrada en torno a 550 nm (eje de la izquierda y puntos verdes) y el cociente de intensidades de los picos centrados en 540 y 557 nm (eje de la derecha y puntos negros). El régimen de saturación (sombreado en morado) comienza cuando el cociente es menor que 1.

Discusión.

Curvas I-P.

Como se explicó en la sección 3.1, las curvas de intensidad de emisión frente a intensidad de potencia permiten estimar el número de fotones involucrados en el proceso de *upconversion*. A raíz de los resultados obtenidos en el intervalo de bajas potencias se puede concluir que las emisiones centradas en torno a 660, 525 y 550 nm requieren la absorción de dos fotones. Este hecho concuerda con lo que predice el modelo genérico presentado en la sección 3.1d, en contraposición con el modelo específico propuesto para la matriz de NaYF₄ que establece que la emisión de la banda del rojo requiere la absorción de tres fotones.

Por otro lado, las pendientes en torno a 1 obtenidas cuando la intensidad de excitación se aumenta por encima de 6 KW/cm^2 determinan que la emisión comienza a saturar. En el régimen de intensidad de bombeo media, la cantidad de fotones incidentes es tal que la población en el nivel excitado $^4\text{I}_{11/2}$ es comparable la del nivel fundamental $^4\text{I}_{15/2}$. Esto hace que únicamente se necesite la absorción de un fotón incidente para que se produzca la emisión en las bandas del rojo y el verde, debido a que la población del nivel intermedio se vuelve independiente de la intensidad de potencia. Además, en este régimen la intensidad de bombeo es tal que pueden alcanzarse niveles superiores de energía por la absorción de un fotón adicional. De esta manera se obtienen emisiones que requieren la absorción de 3 fotones, como la correspondiente a la transición $^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$, tal como queda reflejado en la curva I-P de la **Figura 5.1b**.

Las pendientes menores que 1 obtenidas en el intervalo de potencia alta implican que los niveles de emisión ($^4\text{F}_{9/2}$, $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$, $^2\text{H}_{9/2}$) ya no pueden aumentar más su población. De esta manera la emisión se vuelve independiente del bombeo (ver **Figura 5.1b** y **Figura 5.2**).

Transición al régimen de alta potencia.

Los picos centrados en torno a 540 y 557 nm deberían presentar el mismo comportamiento con la intensidad de excitación, ya que ambos pertenecen a la misma transición ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{13/2}$). Sin embargo esto no es lo que se observa. Este hecho hace pensar que otras transiciones están también contribuyendo.

Empleando los resultados presentados por otros autores para la misma matriz, en esta tesis se propone que el aumento de la emisión en torno a 557 nm (17953 cm^{-1}) se debe a la contribución de la transición $^4\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{13/2}$. [3] Para comprobar esta hipótesis, se compararon los espectros de emisión obtenidos a media y alta potencia. En la **Figura 5.3a** se muestran los espectros de emisión característicos para esos dos regímenes de potencia. Se puede ver claramente el cambio que existe en el cociente de intensidades entre los picos de 540 y 557 nm. Comparando estos espectros se observa que en la banda centrada en 410 nm (ver recuadro en **Figura 5.3a**) aparece un pico de emisión en torno a 416 nm (24038 cm^{-1}) en el régimen de alta intensidad de potencia. Esta emisión es producida por la transición desde uno de los niveles Stark del nivel electrónico $^4\text{H}_{9/2}$ al nivel fundamental $^4\text{I}_{15/2}$ (ver **Figura 5.3b**). Desde ese mismo nivel Stark se genera la transición al nivel $^4\text{I}_{13/2}$ (6085 cm^{-1}) que produce emisión a 557 nm (ver **Figura 5.3b**). Esta transición entre niveles excitados hace que, cuando la intensidad de potencia supera los $6 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$, la intensidad total emitida a 557 nm no corresponda únicamente a la desexcitación radiativa $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$. De esta manera, la intensidad relativa entre los picos de 540 y 557 nm varía con la intensidad de potencia, ya que existen transiciones secundarias que dan lugar a emisión en esas longitudes de onda.

Es importante destacar que este fenómeno solo tiene lugar cuando la excitación empleada es de 980 nm. Como puede verse en la **Figura 5.4a**, para una excitación a 790 nm, se produce el proceso de *upconversion*, pero las bandas no saturan ni siquiera cuando la intensidad de potencia se incrementa hasta los 3.4 MW/cm^2 (en el intervalo de potencia alta). En este caso, únicamente los iones de Er^{3+} intervienen el proceso de *upconversion*. La radiación incidente es absorbida y se produce la transición $^4\text{I}_{15/2} \rightarrow ^4\text{I}_{9/2}$. La probabilidad de transición no radiativa desde el nivel $^4\text{I}_{9/2}$ al $^4\text{I}_{11/2}$ es muy alta, por lo que

el proceso de ESA que tiene lugar es $^4I_{11/2} \rightarrow ^4F_{3/2} / ^4F_{5/2}$ (ver **Figura 5.4b**). De esta manera, cuando se emplea una longitud de onda de excitación de 790 nm, el nivel electrónico $^4H_{9/2}$ no llega a poblarse, por lo que la emisión a 557 nm es únicamente producto de la transición $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$. Se puede ver claramente que niveles altos de energía no llegan a poblarse ya que las emisiones en torno a 694 nm ($^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$) y a 615 nm ($^2G_{9/2} / ^4G_{11/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$) no aparecen en el espectro de emisión cuando el sistema es excitado con radiación de longitud de onda de 790 nm.

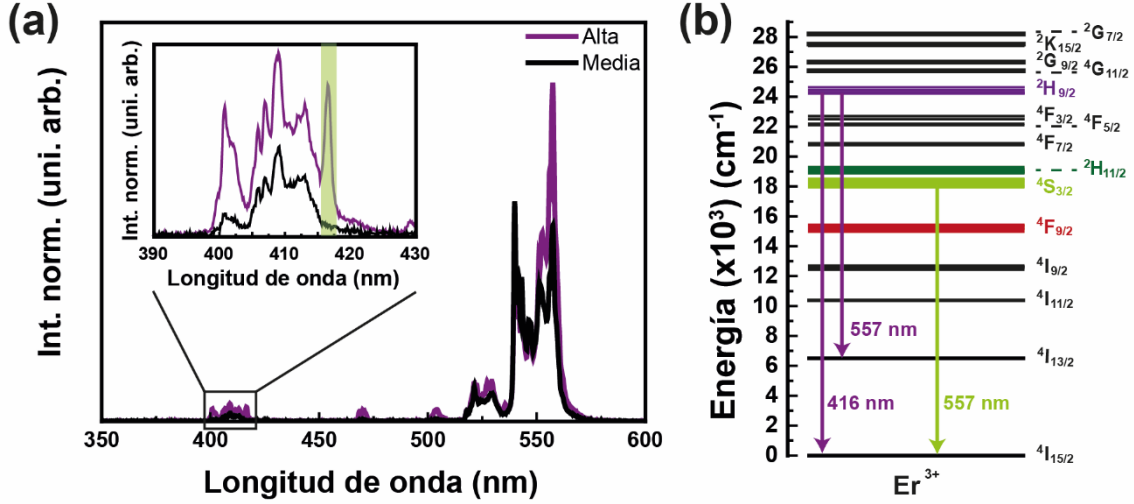


Figura 5.3 Fenómeno de saturación. (a) Espectro de emisión obtenido a 170 KW/cm^2 (negro) y a 4.5 MW/cm^2 (morado). Recuadro: ampliación de la banda de emisión asociada a la transición $^4H_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$. (b) Esquema de niveles en el que se indican las dos transiciones que dan lugar a emisión de 557 nm.

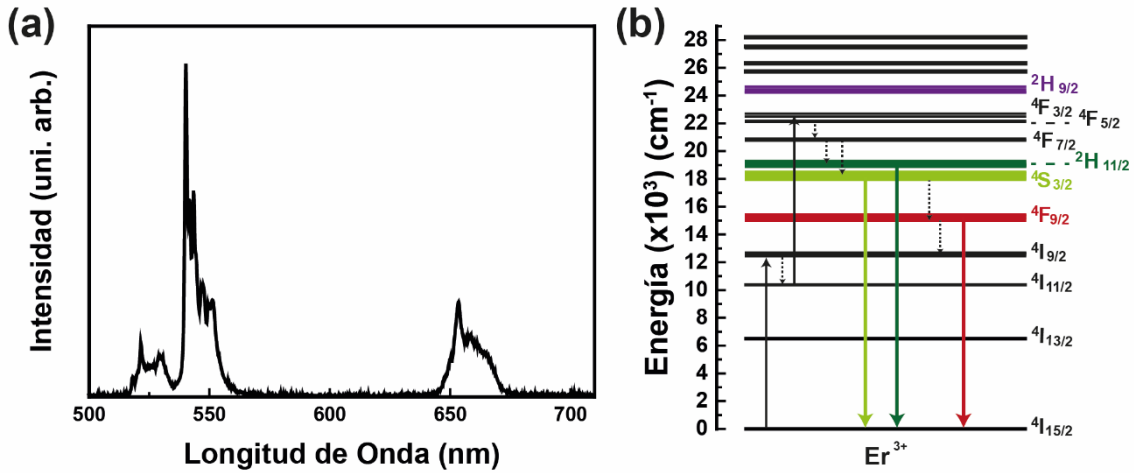


Figura 5.4 Proceso de upconversion con excitación de 790 nm. (a) Espectro de emisión a una intensidad de potencia de 3.4 MW/cm^2 . (b) Diagrama de niveles del proceso de upconversion que tiene lugar.

Este cambio en la intensidad relativa entre los picos de 540 y 557 nm asociados a la transición $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ es de gran importancia, no solo como indicativo de la saturación del sistema. En la termometría mediante el uso de iones Er^{3+} (ver sección 3.5a), la intensidad relativa de las bandas de emisión $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ y $^4H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ se emplea para

determinar la temperatura a la que se encuentra el sistema. El cambio, no debido a la temperatura, en la intensidad de la banda de emisión asociada a la transición $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ a potencias altas dificulta la realización de medidas térmicas empleando este método. Para evitar este problema, únicamente hay que elegir una excitación que no genere transiciones secundarias que den lugar a emisiones en ese intervalo de longitudes de onda o emplear intensidades de potencia moderadas para la longitud de onda de 980 nm junto con el refinamiento del análisis de la emisión (ver sección 5.4). La intensidad de potencia adecuada dependerá de la muestra empleada, pero deberá encontrarse en el intervalo de baja o media densidad de potencia para evitar la saturación del sistema. Además, se deberá emplear, en la medida de lo posible, la misma intensidad de potencia para realizar la calibración de la muestra y para los experimentos de termometría. De esta manera se minimizará el efecto de este fenómeno sobre los experimentos.

Conclusiones.

El estudio realizado no permite determinar de manera inequívoca cuál de los dos modelos explicados en la sección 3.1d (modelo genérico o modelo específico para la matriz NaYF₄) es el que describe el sistema analizado. Sin embargo, las medidas han permitido determinar el intervalo de potencia en el que se produce el proceso a dos fotones.

5.1b- Espectro de emisión de una nanopartícula ópticamente aislada.

La mayoría de los estudios de espectroscopía de nanopartículas de *upconversion* se centran en el análisis de la emisión de un conjunto de ellas dispersas en un disolvente. En este tipo de experimentos, la emisión detectada no corresponderá a una única nanopartícula, sino al conjunto de todas aquellas situadas en el foco de excitación.

El atrapamiento óptico permite confinar una única nanopartícula en dispersión dentro de la región de la trampa. De esta manera se pueden estudiar las propiedades luminiscentes de una única nanopartícula ópticamente aislada, tal y como se demuestra a continuación.

Resultados.

Las nanopartículas estudiadas están compuestas de una matriz de fluoruro de estroncio dopada con iones de Er³⁺ e Yb³⁺ (muestra III). Presentan una forma esférica con un diámetro medio de 8 nm, como puede verse en la **Figura 5.5a**, donde se recoge una imagen de TEM de la muestra. Para los experimentos de atrapamiento óptico, la dispersión de nanopartículas fue introducida dentro de un microcanal donde se focalizó el haz de atrapamiento empleando un objetivo 100X de apertura numérica efectiva 1.3 (ver sección 4.2a para más detalles acerca del sistema experimental).

El atrapamiento óptico de nanopartículas individuales requiere reducir el número de ellas en dispersión para prevenir que múltiples nanopartículas sean atrapadas al mismo tiempo. En estos experimentos se empleó una dispersión en agua pesada con una concentración de 10⁸ nanopartículas/cm³. Esta concentración da lugar a una distancia entre partículas estimada de 10 μm (mayor que el diámetro de la trampa, $2w_0 \approx 0.7 \mu\text{m}$) lo que permite mantener una única nanopartícula en la trampa durante un periodo de más de dos minutos. Para determinar el número de nanopartículas atrapadas se monitorizó la luminiscencia

generada en la región de la trampa. En la **Figura 5.5b** se muestra la luminiscencia detectada por la cámara óptica en función del tiempo cuando se emplea una potencia láser de 40 mW (10^7 W/cm²). Una única nanopartícula pudo ser establemente atrapada durante un periodo de varios minutos, permitiendo la adquisición de su espectro de emisión, lo que requería un tiempo de integración de varias decenas de segundos.

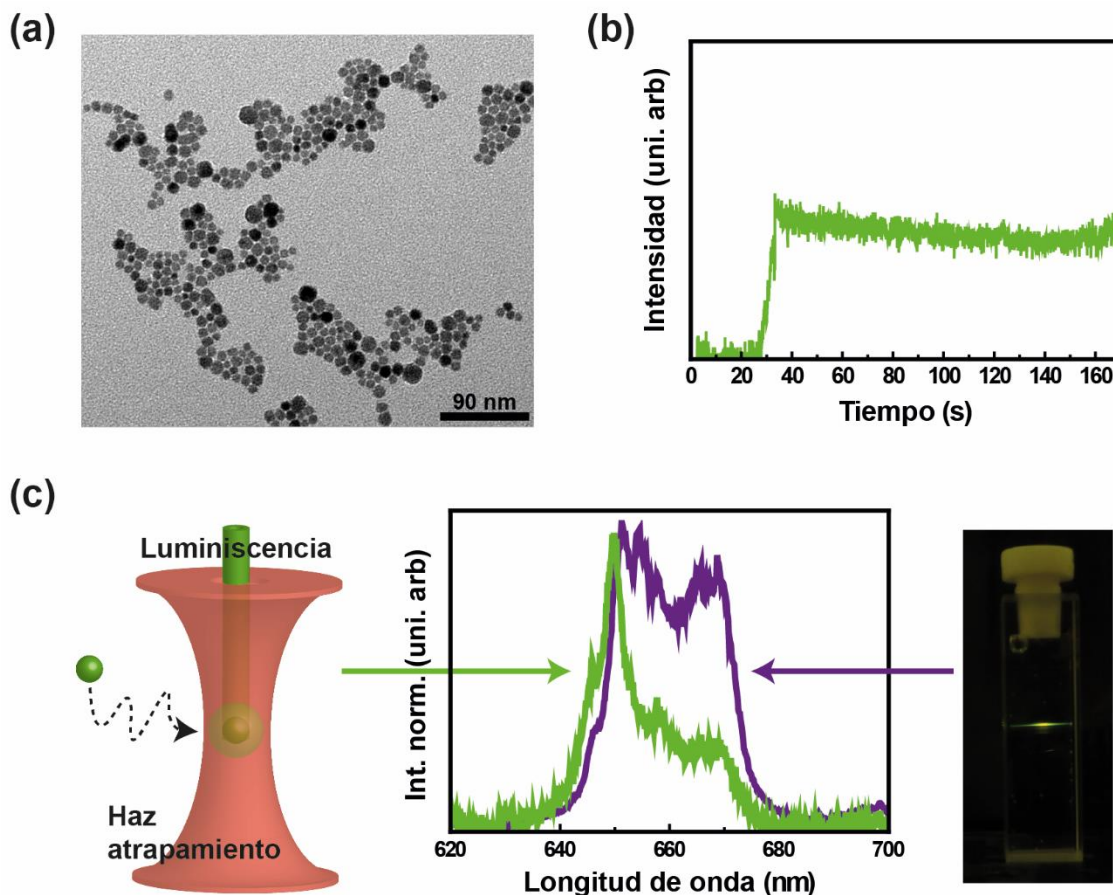


Figura 5.5. Espectro de emisión de una nanopartícula ópticamente aislada. (a) Imagen de TEM de la muestra estudiada. (b) Luminiscencia detectada en la trampa óptica en función del tiempo. (c) Espectros de emisión medidos para una nanopartícula ópticamente aislada (verde) y un conjunto de partículas en dispersión (morado). El esquema de la izquierda muestra a una nanopartícula ópticamente aislada, mientras que la imagen de la derecha muestra una imagen óptica de la emisión del conjunto de partículas.

Una vez una única nanopartícula fue establemente atrapada, se midió su espectro de emisión bajo excitación de 980 nm. Se comprobó experimentalmente que la emisión en el rojo ($^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) era mucho más intensa que la banda de emisión verde ($^4S_{3/2} / ^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$). Esto podía estar debido a la combinación de filtros usada para impedir la llegada del láser al detector, además de los diferentes factores discutidos en la sección 3.2. Por esta razón se estudió únicamente la banda centrada en torno a 650 nm, más accesible experimentalmente. En la **Figura 5.5c** se muestra el espectro de emisión (verde) de una única nanopartícula atrapada (ver esquema de la izquierda). Está caracterizada por alcanzar su máximo de intensidad en torno a 649 nm. Cuando se compara este espectro de emisión con el obtenido para una dispersión de nanopartículas excitada por un haz

poco focalizado (espectro morado e imagen de la derecha en la **Figura 5.5c**), se puede ver que la forma espectral no es la misma. El espectro morado mostrado en la **Figura 5.5c** se obtuvo para una dispersión concentrada de nanopartículas (10^{15} nanopartículas/cm³) empleando un objetivo de baja apertura numérica (0.25 AN) para focalizar el haz de excitación de 980 nm. La distancia entre nanopartículas estimada es de 63 nm por lo que se calcula que 322 nanopartículas se encontraban en el volumen de excitación durante la medida. Los espectros de la **Figura 5.5c** muestran que existe una modulación del espectro debida al número de nanopartículas presentes en el foco de excitación. La principal diferencia radica en la intensidad relativa de los picos centrados en torno a 665 y 649 nm (I_{665}/I_{649}). En el espectro obtenido para una nanopartícula ópticamente aislada el cociente de intensidades es cercano a 0.4 mientras que en el caso del espectro de múltiples partículas el cociente de intensidades aumenta a un valor cercano a 0.8.

Discusión.

Estos resultados muestran que existe una clara diferencia en la forma espectral de la emisión de una única nanopartícula ópticamente aislada y la correspondiente a un conjunto de ellas. Esta diferencia puede atribuirse a los procesos de interacción que tienen lugar entre las nanopartículas en dispersión. Sarkar y colaboradores demostraron que la transferencia de energía entre nanopartículas en dispersión está principalmente gobernada por las colisiones que tienen lugar entre ellas.[4] Estas colisiones permiten que las nanopartículas se acerquen una distancia lo suficientemente pequeña como para que se produzca fenómenos de transferencia de energía entre ellas. Cuanto mayor sea el número de colisiones por unidad de tiempo, mayor será la magnitud de los procesos de transferencia de energía. Si las nanopartículas son confinadas en un espacio reducido (trampa óptica), el número de colisiones aumentará con el número de nanopartículas encerradas en ese volumen. Por esta razón, la magnitud de la interacción dependerá del número de nanopartículas atrapadas. Por consiguiente, el cambio en el espectro de emisión aumentará con el número de nanopartículas dentro de la trampa óptica siempre y cuando éste sea debido a la interacción entre ellas.

Para verificar si la modulación del espectro de emisión se debe a la interacción entre las nanopartículas, se realizó un experimento de atrapamiento secuencial. Se puede aumentar el número de partículas incorporadas en la trampa por unidad de tiempo incrementando la potencia del láser de atrapamiento. A través de la monitorización de la luminiscencia detectada en la cámara óptica (ver sección 4.2a) se estimó que el ritmo de incorporación a la trampa era de una nanopartícula cada 20s (0.05 nanopartículas/s) para una potencia láser de 70 mW (2×10^7 W/cm²). En la **Figura 5.6a** se muestra la evolución del espectro de emisión con el tiempo para un experimento de atrapamiento secuencial a una potencia de 70 mW. Se puede ver cómo tanto la intensidad total como la forma del espectro cambian con el tiempo. El espectro obtenido para un tiempo de 30s (tiempo de adquisición mínimo para garantizar una buena relación señal-ruido) corresponde con el medido para una única partícula ópticamente aislada (verde). Esto implica que durante los 30 primeros segundos únicamente una nanopartícula ha sido atrapada. Al avanzar el tiempo, nuevas nanopartículas van incorporándose secuencialmente a la trampa lo que conlleva un incremento de la interacción entre ellas. Al cabo de 7 min, el espectro medido corresponde con el asociado a un conjunto de nanopartículas interactuando (morado), obtenido para una dispersión concentrada de nanopartículas.

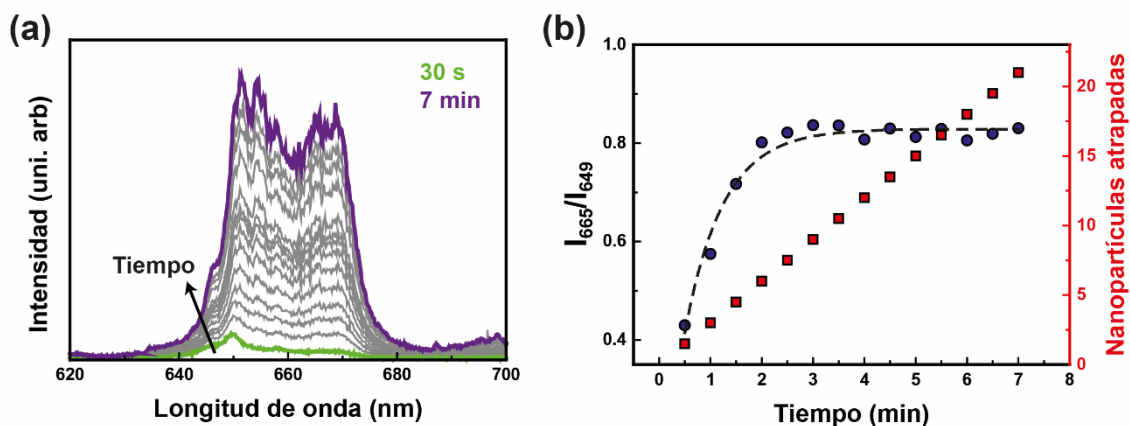


Figura 5.6. Atrapamiento óptico secuencial. (a) Espectros de emisión medidos en función del tiempo. La potencia empleada es de 70 mW. El tiempo de adquisición para cada espectro es de 30 s. Se han resaltados los espectros inicial y final. (b) Evolución del cociente de intensidades de los picos centrados en torno a 649 y 665 nm. Se indica también el número estimado de nanopartículas atrapadas obtenido de un ritmo de incorporación de 0.05 nanopartículas/s.

Para una mejor visualización del fenómeno se estudió la evolución con el tiempo del cociente de intensidades entre los picos centrados en torno a 665 y 649 nm (I_{665}/I_{649}) (ver **Figura 5.6b**). Este crece monótonamente con el número de partículas hasta que satura en un valor de 0.82. Este valor máximo del cociente de intensidades corresponde con el obtenido para la dispersión de nanopartículas empleando un haz de excitación débilmente focalizado (ver **Figura 5.5c**). El valor de saturación se obtiene 2.5 min después de que el atrapamiento secuencial comience, lo que muestra que, en ese tiempo, el número de nanopartículas incorporadas en la trampa (se estima un valor de 7) es tal que la emisión tiene la misma forma espectral que la correspondiente a múltiples partículas.

A raíz de los resultados obtenidos se puede concluir que existe una interacción entre las nanopartículas en dispersión que produce un cambio en el espectro de emisión de los iones Er^{3+} que las componen. Se propone que el mecanismo responsable de la modulación del espectro es la transferencia de energía entre nanopartículas mediada por colisiones. Ésta es debida al solape que existe entre el espectro de emisión y de absorción. De tal manera que existe una probabilidad no nula de que la radiación sea reabsorbida y no llegue a producirse la emisión. Para corroborar esta hipótesis se midió el espectro de absorción de la dispersión de nanopartículas. Como puede verse en la **Figura 5.7a**, el espectro de absorción y el de emisión solapan en el intervalo de longitudes de onda de la banda roja. El solape espectral puede obtenerse a través de las funciones de línea de emisión y la de absorción (ver anexo B.1). El solape calculado para la banda de emisión completa tiene un valor no nulo de $S = 4.6 \times 10^{-14}$ s.

La **Figura 5.7a** muestra que existirá una reabsorción de los fotones de longitud de onda cercana a 650 nm donde tiene lugar el máximo solape. El nivel final de la transición que da lugar a emisión en torno a 650 nm es el nivel fundamental $^4I_{15/2}$, de tal manera que los fotones emitidos pueden ser reabsorbidos parcialmente promoviendo el paso de electrones desde el nivel fundamental al nivel $^4F_{9/2}$. En la **Figura 5.7b** se muestra un esquema de niveles donde está representado este proceso. La reabsorción es prácticamente despreciable en las longitudes de onda cercanas a 665 nm. De esta manera,

el espectro se modula debido a la presencia de este proceso de transferencia de energía mucho más importante en torno a la longitud de onda de 650 nm que en el resto de la banda de emisión.

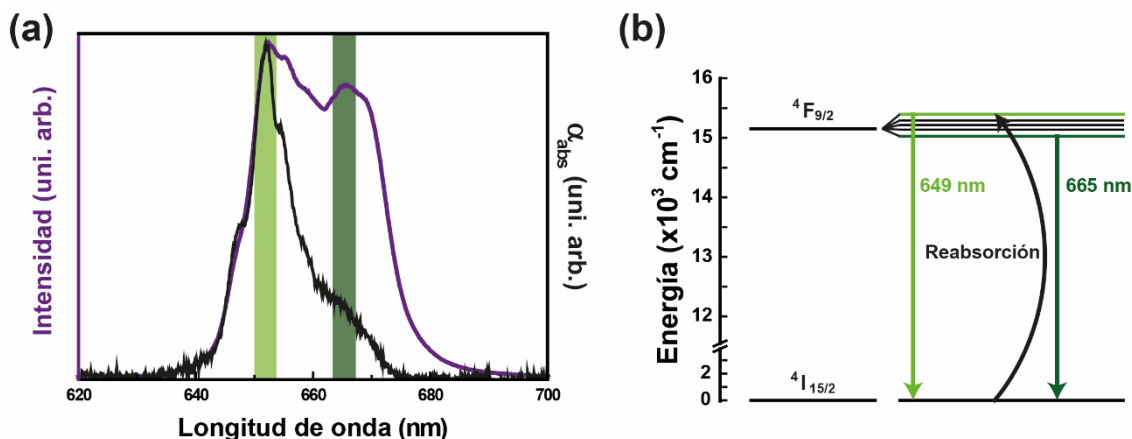


Figura 5.7. Proceso de transferencia de energía entre iones Er^{3+} . (a) Espectro de emisión (morado) y de absorción (negro) de la dispersión de partículas. Se han sombreado los dos picos de interés. (b) Esquema de niveles en el que se indica el proceso de reabsorción de energía al que se le atribuye la modulación del espectro.

La modulación del espectro debida a la interacción entre las nanopartículas a través del proceso de transferencia de energía será mayor al aumentar el número de nanopartículas en la trampa óptica, ya que habrá una mayor probabilidad de que se produzcan colisiones entre ellas. Únicamente se obtendrá el espectro “puro” de una única nanopartícula cuando esta se encuentre ópticamente aislada de tal manera que no pueda interactuar con el resto.

Por último se calculó la distancia (d_{crit} , medida respecto al centro de la partícula) a la que deben estar situadas las nanopartículas para que el proceso de transferencia de energía tenga lugar (ver anexo B.3). Se obtuvo que para que exista una transferencia de energía, las partículas deben estar prácticamente en contacto ($d_{crit} \cong 2R$, con R el radio de las partículas). Este resultado apoya la hipótesis realizada de que la transferencia de energía está mediada por colisiones, tal y como proponían Sarkar y colaboradores.[4]

Conclusiones.

El atrapamiento óptico ha permitido aislar una única nanopartícula en dispersión y estudiar sus propiedades luminiscentes. Experimentalmente se ha demostrado que el espectro de emisión de una nanopartícula ópticamente aislada difiere del medido para un conjunto de ellas. Estas diferencias espectrales se han atribuido a la existencia de una interacción entre las nanopartículas en dispersión. El mecanismo propuesto responsable de la modulación del espectro es la transferencia de energía entre nanopartículas mediada por colisiones.

5.1c- Emisión polarizada.

Por lo general, los trabajos en los que se estudia la emisión polarizada de partículas de *upconversion* se centran en la dependencia de la intensidad total de emisión de una banda

con la dirección de polarización de la luz emitida.[5-7] Sin embargo, en esta tesis se ha demostrado que, dentro de una misma banda de emisión, la intensidad de los niveles Stark también está polarizada.[8, 9]

Se estudió un total de tres tipos de partículas compuestas por una matriz de fluoruro de sodio ytrio (NaYF₄) cristalizada en fase β dopada con iones Er³⁺ e Yb³⁺. El método experimental que se siguió para los estudios de espectroscopía polarizada en partículas aisladas está descrito en detalle en la sección 4.3d. Brevemente, las partículas fueron depositadas sobre una superficie. La luminiscencia se excitó perpendicularmente a esa superficie empleando radiación de longitud de onda de 980 nm. El objetivo de microscopio empleado para focalizar la excitación se empleó también para detectar la luminiscencia. El estado de polarización de la luminiscencia se seleccionó mediante un polarizador lineal colocado a la entrada del detector. En todos los estudios únicamente se seleccionó el estado de polarización de la emisión, en ningún caso el de la excitación.

Resultados.

Los primeros estudios realizados mostraron que la banda de emisión en el rojo ($^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) presentaba un mayor y más claro cambio con la polarización que la emisión en el verde ($^2H_{11/2} / ^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) (ver anexo C). Por esta razón, todos los estudios se centraron en la banda de emisión en el rojo. A continuación se detallan los resultados obtenidos para las diferentes geometrías de partícula.

Partículas cilíndricas.

Se estudiaron dos tamaños de partícula distintos. La parte superior de la **Figura 5.8a** recoge una imagen TEM representativa de las muestras de menor tamaño (0.14 x 1.1 μ m) estudiadas (muestra IV). Por simplicidad únicamente se muestran los resultados obtenidos para estas partículas, aunque se realizó un estudio análogo para las partículas de mayor tamaño (1.4 x 3.7 μ m). Debido a su geometría, las partículas cilíndricas quedan depositadas con su eje longitudinal perpendicular a la dirección de excitación/detección (ver **Figura 5.8a** abajo). En la **Figura 5.8b** se muestran dos espectros de emisión obtenidos seleccionando dos estados de polarización perpendiculares: a lo largo de (morado) y perpendicularmente (verde) al eje longitudinal (ver **Figura 5.8a**, arriba). Se puede ver como la forma de la banda de emisión cambia. La intensidad de los picos centrados en torno a 652 y 660 nm se modifica drásticamente cuando se analiza la luminiscencia generada con polarización perpendicular o paralela al eje longitudinal de la partícula. Este hecho puede mostrarse de manera más clara en un diagrama polar donde se represente el cociente ($C = I_{652}/I_{660}$) entre las intensidades emitidas a esas longitudes de onda en función del estado de polarización. En la **Figura 5.8c** se puede ver claramente como I_{652}/I_{660} cambia de manera periódica con el estado de polarización. Se comprobó que el valor máximo de I_{652}/I_{660} corresponde con la situación en la que la polarización de la luminiscencia es paralela al eje longitudinal de la partícula.

El grado de polarización del sistema (γ) puede determinarse a través de las intensidades máxima (I_{max}) y mínima (I_{min}) según la expresión:[6]

$$\gamma = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (5.1)$$

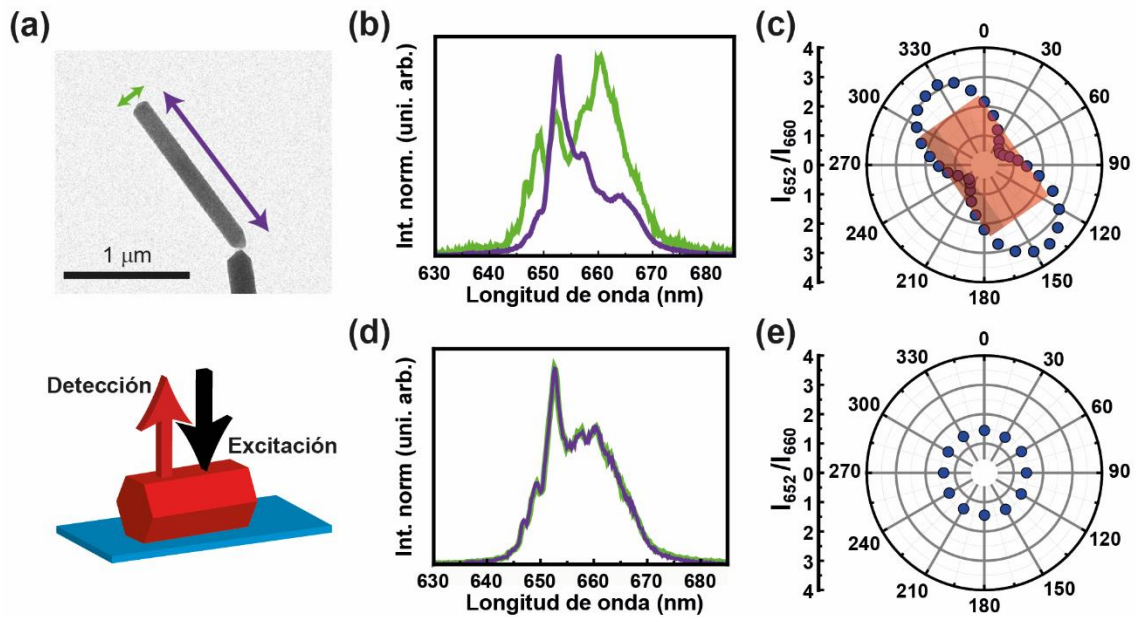


Figura 5.8. Espectroscopía polarizada de una partícula cilíndrica. (a) Arriba: Imagen de TEM representativa de las partículas estudiadas; abajo: esquema de la excitación y detección de la luminiscencia. (b) Espectros de emisión obtenidos de una partícula depositada para los dos estados de polarización indicados en (a). (c) Diagrama polar del cociente de intensidades en función del estado de polarización para una partícula depositada. (d) Espectro de emisión de la dispersión de partículas para dos estados de polarización perpendiculares. (e) Diagrama polar del cociente de intensidades en función del estado de polarización para la dispersión de partículas.

Para obtener los valores de I_{max} e I_{min} , se integra la intensidad total sin normalizar de la banda de interés para cada uno de los estados de polarización. I_{max} corresponderá con el valor máximo hallado e I_{min} con el mínimo. γ toma valores entre 0 y 1, de tal manera que valores cercanos a 0 implican que el sistema no está polarizado, mientras que un grado de polarización cercano a 1 caracteriza a un proceso completamente polarizado. Para el tamaño de partícula representado en la **Figura 5.8** se obtiene que el grado de polarización para la banda completa (todo intervalo de longitudes de onda que comprenden la banda de emisión roja) es 0.9, mientras que para los picos de 652 y 660 nm el valor obtenido es 0.7 y 0.8, respectivamente. Para las partículas cilíndricas de 3.7 μm de largo, γ toma un valor de 0.6 en los tres casos. Estos resultados muestran que las partículas de tamaño más reducido, pero mayor relación de aspecto, presentan un grado de polarización mayor (ver **Tabla 5.1**).

Por otro lado, una dispersión de partículas constituye un sistema despolarizado ya que éstas se encuentran orientadas de manera aleatoria. En la **Figura 5.8d** se muestran dos espectros de emisión correspondientes a dos estados de polarización perpendiculares obtenidos de una dispersión de partículas cilíndricas de tamaño 0.14 x 1.1 μm. No se aprecia ningún cambio en la forma espectral de la banda de emisión. En este caso, I_{652}/I_{660} es independiente del estado de polarización (ver **Figura 5.8e**). Se puede ver además que I_{652}/I_{660} toma un valor entre el máximo y el mínimo obtenidos para la partícula depositada. El valor de γ para la dispersión de partículas es de 0.2. Este valor cercano a cero indica que el sistema está despolarizado.

| Geometría | Tamaño (μm) | Configuración | 652 nm | γ 660 nm | Banda | $C_{max} - C_{min}$ |
|------------|--------------------------|---------------|--------|--------------------|-------|---------------------|
| Cilíndrica | 0.14 x 1.1 | Depositada | 0.9 | 0.7 | 0.8 | 2.78 |
| | | Dispersión | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.07 |
| Cilíndrica | 1.4 x 3.7 | Depositada | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 1.55 |
| Disco | 3 x 1.6 | Vertical | 0.5 | 0.4 | 0.2 | 2.74 |
| | | Horizontal | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.11 |
| Disco | 2 x 0.7 | Vertical | 0.9 | 0.4 | 0.7 | 3.36 |
| | | Horizontal | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 0.16 |
| Disco | 1.5 x 0.5 | Vertical | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 1.73 |
| | | Horizontal | 0.6 | 0.7 | 0.6 | 0.15 |
| Disco | 0.8 x 0.4 | Vertical | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 1.51 |
| | | Horizontal | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 0.11 |
| Esférica | 0.026 | Depositada | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.26 |

Tabla 5.1. Grado de polarización para distintas geometría de partícula. Se recogen los resultados obtenidos de la espectroscopía polarizada para partículas de $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ con diferente geometría. Se indican tanto el grado de polarización (γ) como la diferencia entre los cocientes de intensidades (C) máximo y mínimo. La columna “banda” recoge los valores para la banda completa del rojo.

Partículas en forma de disco.

Se estudió un total de cuatro tamaños distintos de partícula (**Tabla 5.1**). En la parte superior de la **Figura 5.9a** se muestra una imagen TEM representativa de las muestras estudiadas (muestra II). El depósito de las partículas sobre una superficie permite acceder a dos orientaciones distintas de éstas respecto al haz láser de excitación (ver **Figura 5.9a**, abajo). En la denominada configuración vertical la partícula se orienta con su cara hexagonal paralela a la dirección de propagación de haz de excitación, mientras que la orientación horizontal la cara hexagonal es perpendicular a ésta. A continuación se describen los resultados obtenidos para partículas de 3 μm de diámetro y 1.6 μm de grosor. Se obtuvieron resultados análogos para el resto de partículas en forma de disco.

- *Configuración vertical:* En la **Figura 5.9b** se muestran los espectros obtenidos para una partícula vertical. Se puede ver cómo la forma espectral de la emisión es distinta dependiendo de si se detecta la luminiscencia con polarización paralela al eje longitudinal (verde) o perpendicular a éste (morado). En esta orientación, existe una variación del cociente de intensidades semejante a la obtenida para las partículas cilíndricas (**Figura 5.9c**). En este caso, el valor máximo del cociente se obtiene cuando se detecta la luminiscencia con polarización perpendicular al eje longitudinal de la partícula.

- *Configuración horizontal:* Cuando la partícula se ha depositado horizontalmente, la forma espectral de la banda no cambia con el estado de polarización (**Figura 5.9d**). Esto queda patente al analizar el diagrama polar (**Figura 5.9e**), que muestra un cociente de intensidades independiente del estado de polarización de la luminiscencia.

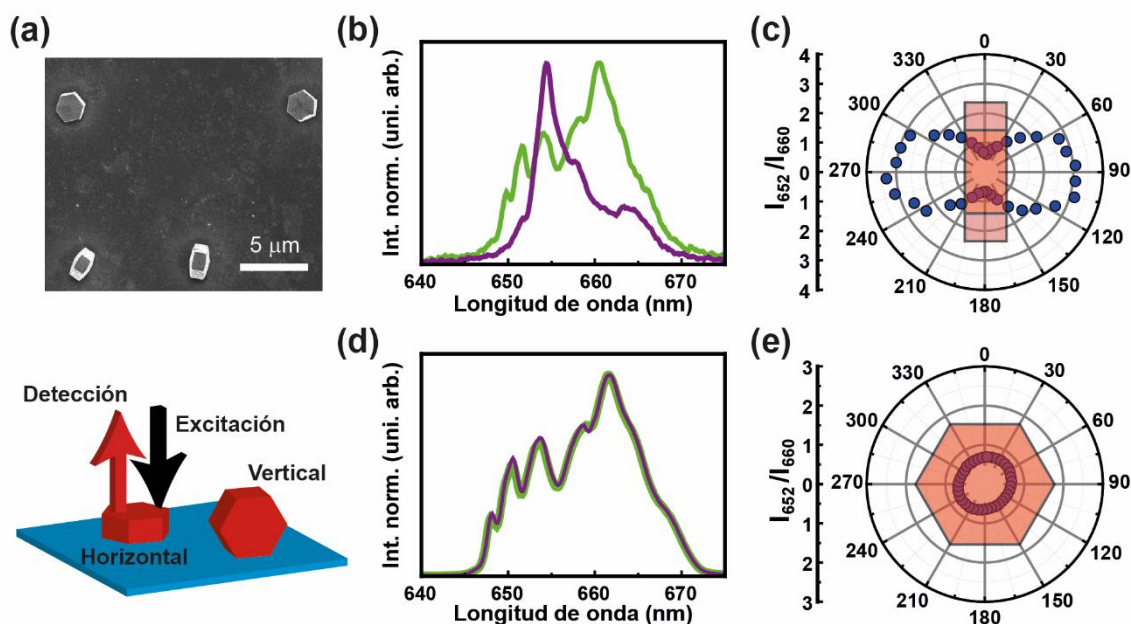


Figura 5.9. Espectroscopía polarizada de una partícula en forma de disco. (a) Arriba: Imagen de TEM representativa de las partículas a estudio; abajo: esquema de la excitación y detección de la luminiscencia. (b) Espectros de emisión obtenidos para una partícula en orientación vertical para dos estados de polarización perpendiculares. (c) Diagrama polar del cociente de intensidades en función del estado de polarización para una partícula en orientación vertical. (d) Espectro de emisión para una partícula en orientación horizontal para dos estados de polarización perpendiculares. (e) Diagrama polar del cociente de intensidades en función del estado de polarización para una partícula en orientación horizontal.

Los resultados obtenidos para distinto tamaño de partícula muestran que el grado de polarización es alto cuando las partículas están depositadas en vertical, sin embargo, su valor disminuye para la configuración horizontal. Aparece también una tendencia en la que el grado de polarización aumenta cuando la relación de aspecto crece, al igual que ocurría con las partículas cilíndricas.

Partículas esféricas.

Las partículas esféricas estudiadas (muestra I) presentan un recubrimiento de sílice (ver **Figura 5.10a**). El núcleo central, formado por la partícula de *upconversion* propiamente dicha, tiene un radio de 26 nm. La matriz que forma todas las partículas aquí estudiadas tiene geometría esférica para diámetros de partícula de hasta 30 nm aproximadamente. A partir de ese radio de partícula, la geometría cambia y empiezan a formarse partículas en forma de disco con faceta hexagonal debido a que la matriz cristaliza en fase β . Con esto se quiere decir que, para poder estudiar partículas formadas por la matriz de β -NaYF₄ que tengan geometría esférica, hay que trabajar con tamaños de partícula menores que 30 nm, que están por debajo del límite de resolución del sistema experimental. Por esta razón, es conveniente aumentar el tamaño de la partícula sin modificar sus propiedades luminiscentes o su geometría para así poder realizar estos estudios. Las partículas recubiertas de sílice tienen un tamaño total de 104 nm, que ya permite que sean detectadas ópticamente.

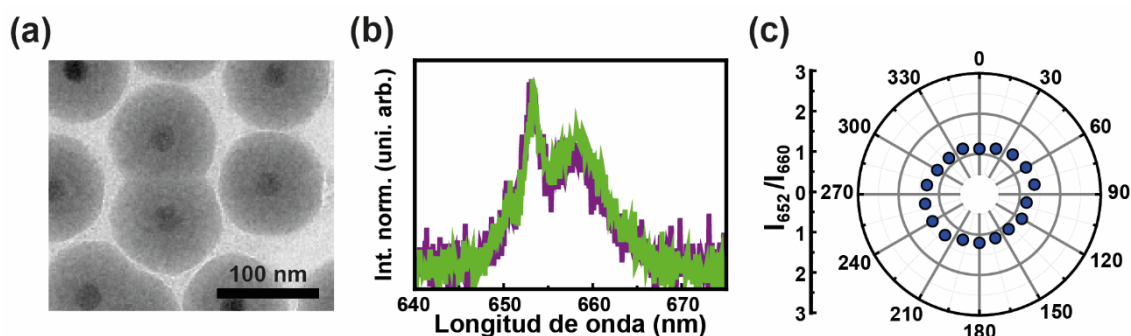


Figura 5.10. Espectroscopía polarizada de una partícula esférica. (a) Imagen TEM de las partículas a estudio (b) Espectros de emisión para dos polarizaciones. (c) Diagrama polar del cociente de intensidades en función del estado de polarización.

Los resultados obtenidos para esta geometría de partícula están recogidos en la **Figura 5.10**. Puede verse cómo la forma espectral de la banda de emisión no cambia con el estado de polarización (**Figura 5.10b**). Este resultado queda patente en el diagrama polar de la **Figura 5.10c**. Además, el espectro de emisión es semejante al obtenido para una suspensión de partículas (ver **Figura 5.8d**).

Discusión:

Una vez presentados los resultados para cada geometría de partícula, se puede hacer un análisis del comportamiento de la emisión polarizada basado en el trabajo publicado por Chen y colaboradores.[5] Las partículas estudiadas por estos autores están compuestas por la misma matriz que las estudiadas en esta tesis y presentan una geometría de disco hexagonal. Estos autores aseguran en su estudio que este tipo de partícula está formado por un cristal uniaxial cuyo eje óptico es perpendicular a la cara hexagonal. Esta afirmación puede extrapolarse al caso de las partículas en forma de disco hexagonal aquí estudiadas. Tendiendo esto en cuenta, la luminiscencia de las partículas en forma de disco depositadas puede ser detectada en tres estados de polarización: σ , α y π (ver **Figura 5.11**). La polarización σ corresponde con la luz propagándose a lo largo del eje óptico con un estado de polarización perpendicular a él (**Figura 5.11a**). En los estados de polarización α y π , la luz se propaga perpendicularmente al eje óptico con un estado de polarización perpendicular (α , **Figura 5.11b**) o paralelo (π , **Figura 5.11c**) a éste. Cuando la partícula está en la configuración horizontal, únicamente la polarización σ puede estudiarse. Sin embargo, cuando se encuentra en la configuración vertical, tanto el estado de polarización α como el π son accesibles. En la **Figura 5.11** se han incluido los espectros de emisión para cada uno de los estados de polarización obtenidos para partículas en forma de disco hexagonal de 2 μm de diámetro. Se puede ver cómo las polarizaciones α y σ son equivalentes: sus espectros de emisión correspondientes tienen la misma forma espectral. Solo cuando la luminiscencia detectada se propaga perpendicularmente al eje óptico con una polarización paralela a él (polarización π) se obtiene un espectro distinto. Estos resultados concuerdan con la suposición anteriormente realizada de que las partículas son cristales uniaxiales cuyo eje óptico es perpendicular a la cara hexagonal (eje z en la **Figura 5.11**). Cabe recordar que, en los cristales uniaxiales, la luminiscencia que se detecta a lo largo del eje óptico es independiente del estado de polarización.

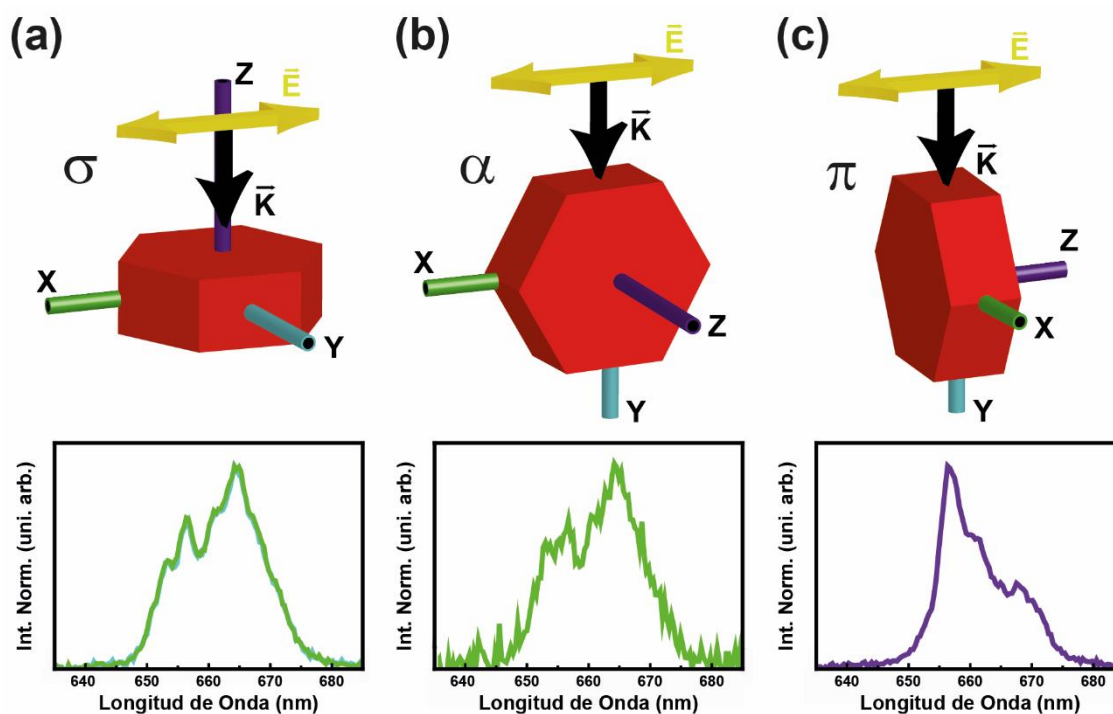


Figura 5.11. Diferentes estados de polarización para una partícula en forma de disco. Se indican la dirección de propagación de la luminiscencia (\vec{k}) y su polarización (\vec{E}). Los espectros de emisión son aquellos obtenidos para cada uno de los estados de polarización indicados. (a) Polarización σ : la luz se propaga a lo largo del eje óptico con polarización perpendicular a él. (b) Polarización α : la luz se propaga perpendicularmente al eje óptico con polarización perpendicular a él. (c) Polarización π : la luz se propaga perpendicularmente al eje óptico con polarización paralela a él.

El análisis realizado para las partículas en forma de disco puede aplicarse a las partículas cilíndricas. Éstas se pueden visualizar como partículas en forma de disco apiladas a lo largo de su eje óptico. Ambos tipos de partícula están formados por la misma matriz, únicamente se diferencian en la dirección que ha seguido su crecimiento. De este modo, el eje óptico de las partículas cilíndricas es paralelo a su eje longitudinal. Para una mejor visualización, se han representado en la **Figura 5.12** los espectros obtenidos para los estados de polarización accesibles cuando la partícula cilíndrica está depositada. La forma espectral de la emisión para las polarizaciones α y π es la misma tanto para las partículas cilíndricas como para las que tienen forma de disco (comparar **Figura 5.11** y **Figura 5.12**). Estos resultados aventuran que si se recogiera la emisión a lo largo del eje longitudinal (eje óptico) de las partículas cilíndricas, su forma espectral sería equivalente a la obtenida para la polarización σ en el caso de las partículas en forma de disco. Además, debería coincidir con la emisión medida para la polarización α .

Los resultados obtenidos para las partículas esféricas evidencian que éstas no presentan una emisión polarizada. La despolarización de la emisión puede deberse a el mayor número de defectos de red que presentan las partículas de 26 nm de diámetro al tener una mayor relación superficie-volumen. Esto hace que la emisión total se module y no presente la misma dependencia con la polarización que en el caso de partículas cilíndricas y con forma de disco en las que la proporción de defectos de superficie es menor.

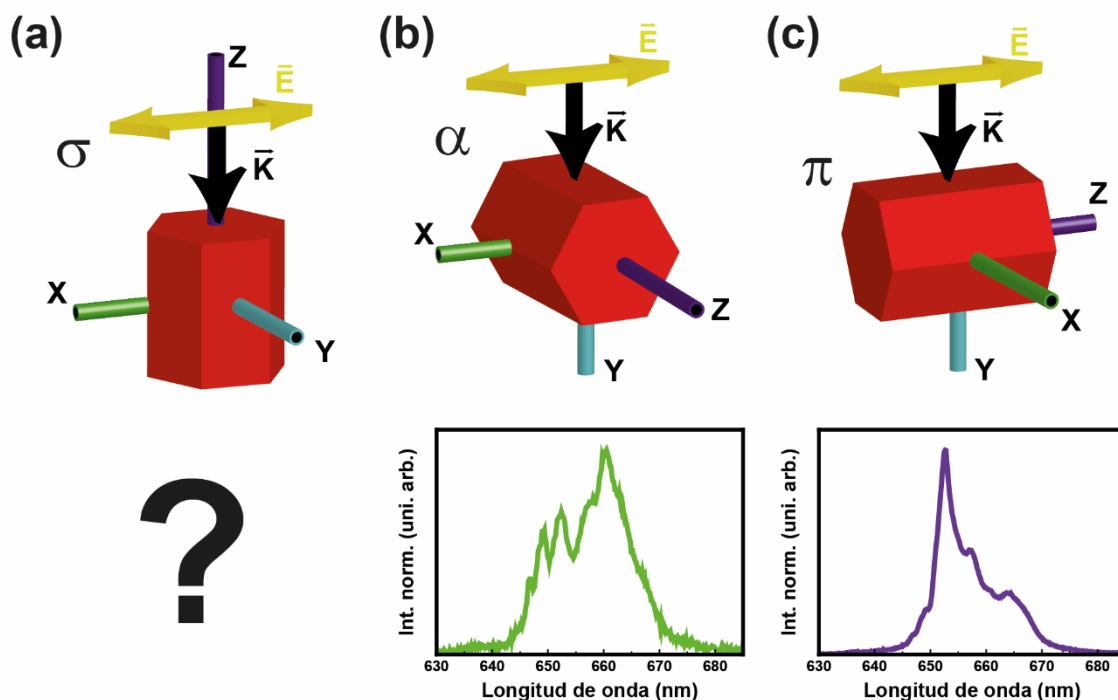


Figura 5.12 *Diferentes estados de polarización para una partícula cilíndrica. Se indican la dirección de propagación de la luminiscencia (\vec{k}) y su polarización (\vec{E}). Los espectros de emisión son aquellos obtenidos para cada uno de los estados de polarización indicados. (a) Polarización σ : la luz se propaga a lo largo del eje óptico con polarización perpendicular a él. En estos experimentos no pudo medirse el espectro de emisión para ese estado de polarización. (b) Polarización α : la luz se propaga perpendicularmente al eje óptico con polarización perpendicular a él. (c) Polarización π : la luz se propaga perpendicularmente al eje óptico con polarización paralela a él.*

Conclusiones.

Los estudios de luminiscencia polarizada han demostrado que partículas cilíndricas y en forma de disco presentan una luminiscencia altamente polarizada. Este hecho se ha explicado teniendo en cuenta la estructura uniaxial de la red cristalina que forma las partículas, cuyo eje óptico preferencial es perpendicular a la cara hexagonal de éstas. Por otro lado, este estudio también permite concluir que las partículas esféricas no presentan una luminiscencia polarizada, hecho que se atribuye a la presencia de defectos de red.

5.2- Determinación de la orientación de partículas atrapadas.

En los experimentos de atrapamiento óptico de partículas de *upconversion* se puede extraer información de la luminiscencia de la partícula atrapada que, como se ha demostrado en la sección anterior, depende de su estado de polarización y, por consiguiente, de la orientación de la partícula respecto a la dirección de detección. Por lo tanto, para una interpretación correcta de dichos experimentos, es esencial conocer la orientación de la partícula en la trampa.

En esta sección se muestra cómo es posible determinar de forma inequívoca la orientación de partículas cilíndricas y en forma de disco cuando son atrapadas ópticamente. En el primer caso se emplearon pinzas ópticas de uno y dos haces. En el segundo, se incluyen

cálculos teóricos para determinar el origen de los torques ópticos responsables de la orientación de la partícula.

En la sección 5.1c se ha demostrado que la luminiscencia de partículas de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ está polarizada. Este hecho hace que el espectro total de la partícula esté modulado. La forma espectral de la emisión depende de la existencia de un eje óptico en el cristal y de cómo esté orientada la partícula. En la **Figura 5.13** se pueden ver los espectros despolarizados (sin que se seleccione ningún estado de polarización) para las diferentes geometrías de partícula estudiadas, depositadas en diferentes orientaciones respecto a la dirección de excitación/detección. Estos resultados evidencian que el análisis del espectro de emisión de partículas ópticamente atrapadas puede proporcionar información muy importante acerca de su orientación dentro de la trampa. Sin embargo, para determinar la orientación exacta de las partículas cuando son ópticamente atrapadas es necesario el uso de la espectroscopía polarizada. El espectro de emisión despolarizado permite diferenciar entre distintas configuraciones (ver **Figura 5.13c-d**), pero para caracterizar completamente la orientación es necesario analizar el estado de polarización.

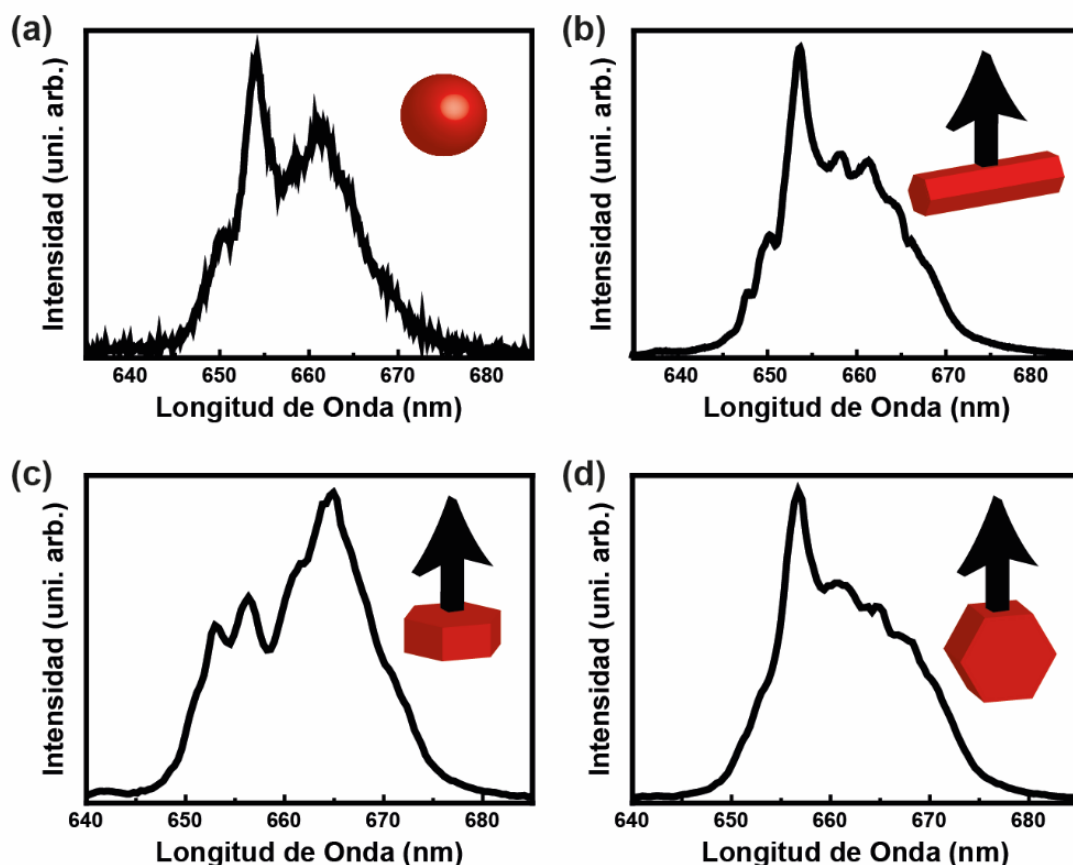


Figura 5.13. Espectros despolarizados para diferentes geometrías y orientaciones de partícula. (a) Partícula esférica. (b) Partícula cilíndrica con eje horizontal perpendicular a la dirección de detección. (c) Partícula en forma de disco con cara hexagonal perpendicular a la dirección de detección (configuración horizontal). (d) Partícula en forma de disco con cara hexagonal paralela a la dirección de detección (configuración vertical). Los esquemas al lado de cada espectro indican la dirección de detección.

El procedimiento experimental llevado a cabo es análogo al empleado en los estudios de partículas depositadas (sección 4.3d). La diferencia reside en que, en este caso, las partículas no se depositaron sobre una superficie, sino que se encontraban suspendidas en una dispersión acuosa, lo que permitía su atrapamiento óptico. Se analizó la forma espectral de la emisión roja (${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) respecto al estado de polarización y se calculó el cociente entre las intensidades de los picos situados en torno a 652 y 660 nm. Tanto la forma espectral de la banda como la evolución con el estado de polarización del cociente de intensidades se emplearon para determinar la orientación de las partículas. Al igual que en la sección anterior, únicamente se seleccionó el estado de polarización de la luminiscencia, en ningún caso el de la excitación.

5.2a- Partículas cilíndricas.

Se estudiaron partículas cilíndricas de 140 nm de diámetro y 1.1 μm de longitud (muestra IV). Como esta detallado en la sección 4.3d, una dispersión acuosa diluida de las partículas (5×10^9 partículas/ cm^3) se introdujo en un microcanal donde el láser de atrapamiento fue focalizado empleando un objetivo 100X de apertura numérica 1.25. La concentración de partículas empleada permite el atrapamiento óptico de una única partícula, de tal manera que su espectro de emisión pudo ser analizado en función del estado de polarización.

Resultados.

Una única trampa óptica.

En la **Figura 5.14a** se representa un mapa en dos dimensiones que recoge la intensidad normalizada medida en el intervalo de 630 a 685 nm para los distintos estados de polarización. En la parte inferior se recogen los espectros de emisión para los dos estados de polarización indicados (0 y 90°). Se puede ver que la emisión centrada en torno a 652 y 660 nm permanece constante independientemente del estado de polarización. Este hecho queda constatado en el diagrama polar de la **Figura 5.14b** en que se presenta el cociente de intensidades a esas dos longitudes de onda en función del estado de polarización.

Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en los experimentos de espectroscopía polarizada de las partículas depositada (sección 5.1c). Los espectros de emisión obtenidos cuando la partícula esta ópticamente atrapada tienen la forma espectral de aquellos medidos para el estado de polarización α (ver **Figura 5.12b**). Además, la forma del espectro de emisión no cambia con el estado de polarización. Esto implica que el estado de polarización π no es accesible cuando la partícula está atrapada. Únicamente en el estado de polarización σ el espectro de emisión es independiente de la orientación de la polarización. Este estado de polarización corresponde con la luz propagándose a lo largo del eje óptico (ver **Figura 5.12a**), y por consiguiente, con polarización perpendicular a él. Este resultado permite concluir que las partículas cilíndricas se atrapan con su eje óptico paralelo al haz de atrapamiento, o lo que es lo mismo, con su eje longitudinal orientado a lo largo de la dirección de propagación del haz, tal y como muestra la representación esquemática de la **Figura 5.14c**.

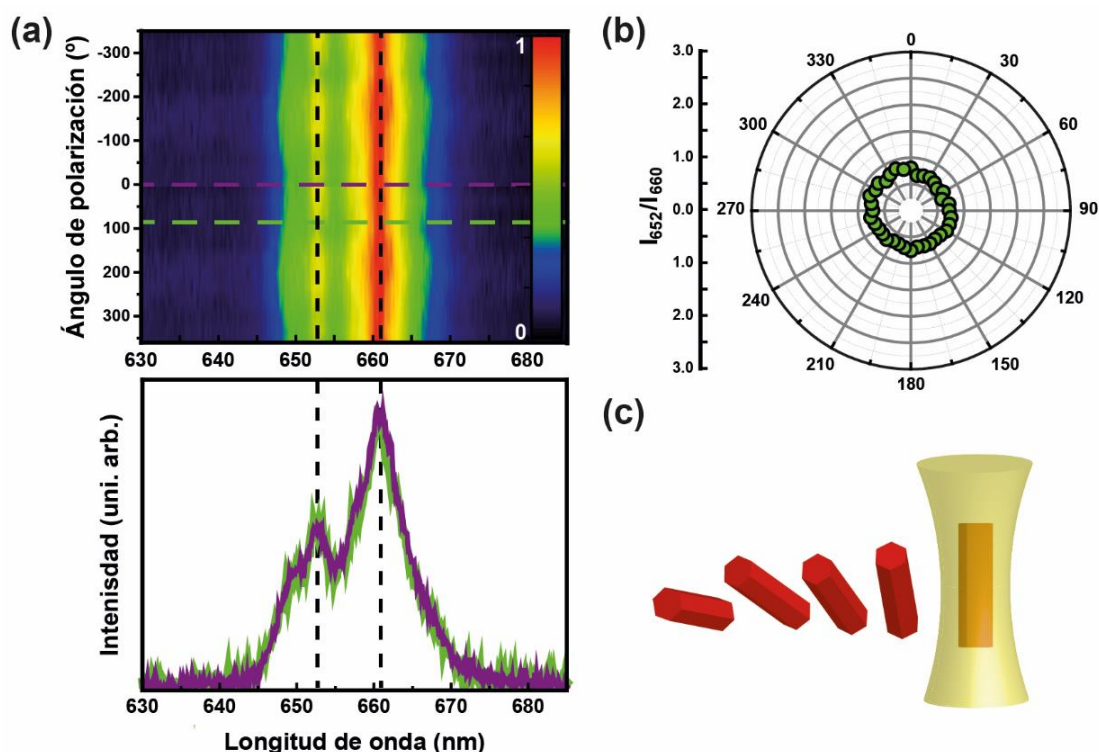


Figura 5.14. Espectroscopía polarizada de una partícula cilíndrica ópticamente atrapada. (a) Arriba: Mapa en dos dimensiones de la intensidad normalizada para las diferentes longitudes de onda para los distintos estados de polarización. Abajo: Espectros de emisión para los dos estados de polarización indicados en el mapa de luminiscencia. (b) Diagrama polar del cociente de intensidades en función del estado de polarización. (c) Representación esquemática de la orientación de la partícula cuando es atrapada.

Dos trampas ópticas.

Se quiso también determinar la orientación de partículas cilíndricas cuando son atrapadas empleando dos trampas ópticas. Estos experimentos se realizaron en la Heriot-Watt University de Edimburgo (Reino Unido), en los laboratorios del grupo de investigación liderado por el profesor Ajoy Kar Kumar. El sistema experimental empleado está descrito en la sección 4.2a. Se utilizó un polarizador lineal cuyo eje de polarización coincidía con la línea de unión de las dos trampas (flechas blancas en **Figura 5.15**). El sistema experimental permitía el control de la posición relativa de las dos trampas, como puede verse en el esquema de los paneles de la derecha en la **Figura 5.15**. Dependiendo de la distancia entre trampas se pueden dar dos situaciones distintas:

Trampas independientes. Cuando las trampas se sitúan a una distancia mayor de una micra, éstas actúan como si fueran dos trampas independientes y aisladas entre sí. En los paneles superiores de la **Figura 5.15** se muestra una partícula atrapada por la trampa inferior. El espectro de emisión medido coincide con el obtenido cuando únicamente se emplea una trampa óptica (**Figura 5.14a**) indicando que la partícula se encuentra en la trampa orientada con su eje longitudinal paralelo a la dirección de propagación del haz de atrapamiento.

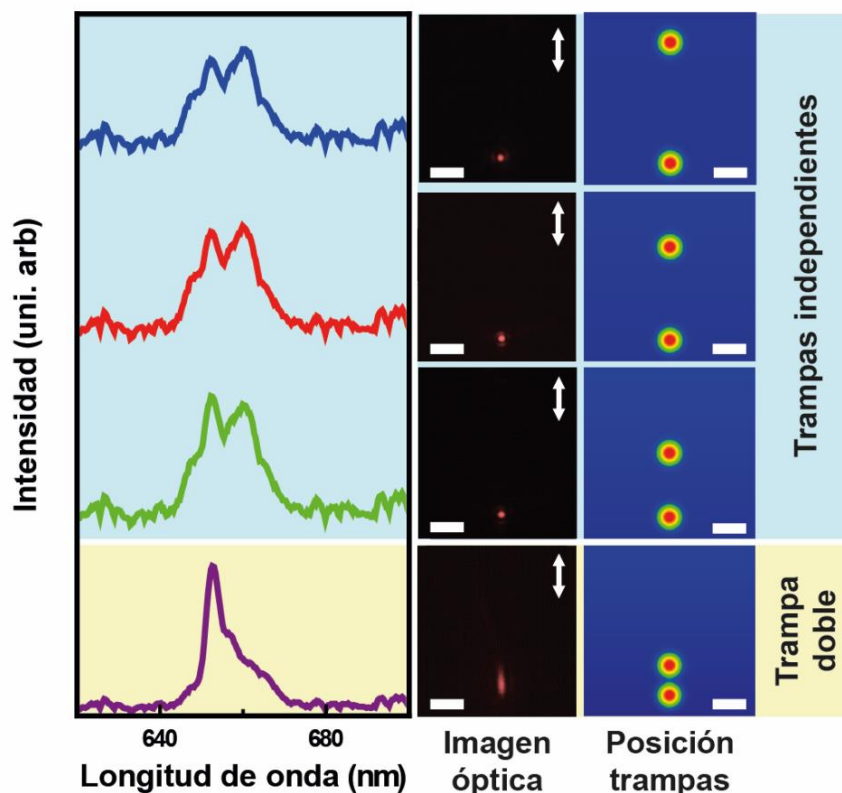


Figura 5.15. *Manipulación de partículas cilíndricas empleando dos trampas. Se muestran los espectros de emisión medidos a lo largo de la línea que une las dos trampas (las flechas blancas indican la orientación del polarizador). La escala corresponde a 1 μm en todos los casos.*

Trampa doble. Cuando la distancia entre las trampas se reduce y se alcanza una separación del orden de una micra, ambas trampas pueden actuar sobre la misma partícula. En esta situación el espectro de emisión medido cambia (ver panel inferior **Figura 5.15**) y se obtiene el correspondiente al estado de polarización π : la luz detectada se propaga perpendicularmente al eje óptico de la partícula y tiene una polarización paralela a él (ver **Figura 5.12c**). Este resultado indica que cuando las trampas son capaces de actuar a la vez sobre la partícula ésta se orienta con su eje longitudinal paralelo a la línea que las une.

La actuación simultánea de las dos trampas permite manipular la partícula atrapada en una nueva dirección del espacio. Alterando la posición relativa de las trampas (sin variar la distancia entre ellas) se puede modificar de manera controlada la orientación de la partícula en el plano perpendicular a la dirección de propagación de los haces de atrapamiento. Partiendo de la situación mostrada en los paneles inferiores de la **Figura 5.15**, se varió la posición de la trampa superior (ver diagrama esquemático de la derecha en la **Figura 5.16**) de tal manera que la orientación de la partícula fue rotada 90° respecto a su posición original (ver imágenes ópticas de la **Figura 5.16**). La orientación de la partícula se monitorizó a través de su espectro de emisión. En la parte izquierda de la **Figura 5.16** se puede observar cómo el espectro de emisión cambia del correspondiente al estado de polarización π al característico del estado de polarización α , evidenciando una rotación de la partícula de 90° .

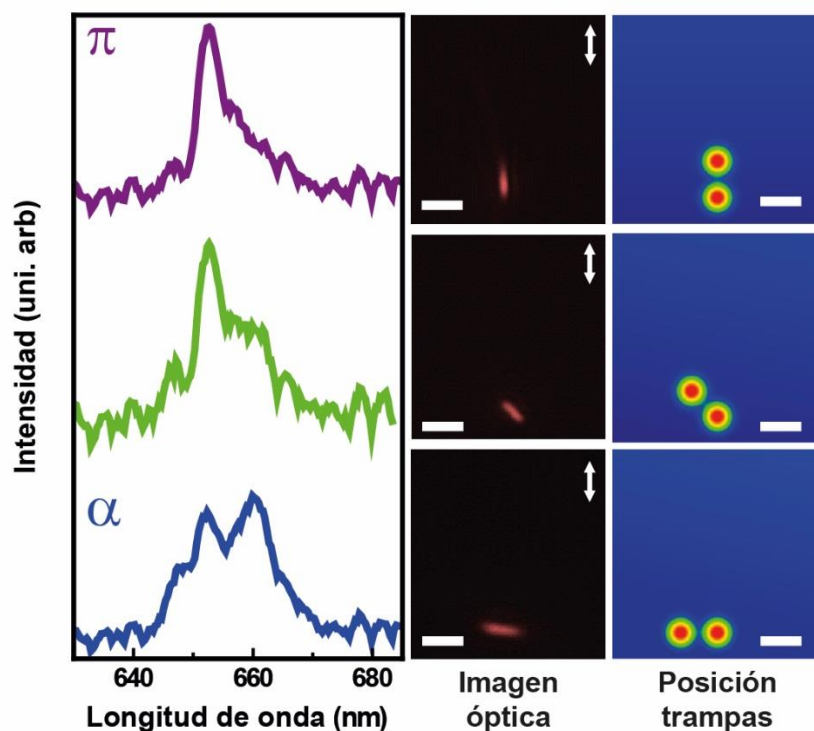


Figura 5.16. Manipulación de una partícula cilíndrica en el plano perpendicular a la dirección de propagación de los haces de atrapamiento. Se muestran los espectros de emisión medidos a lo largo de una dirección de polarización fija indicada por las flechas blancas. La escala corresponde a 1 μm en todos los casos.

Conclusiones.

Gracias al análisis de la emisión polarizada de la partícula cilíndrica se ha podido determinar que ésta se orienta con su eje longitudinal paralelo al haz de láser al ser atrapada ópticamente. Debido a su geometría alargada se pudo manipular las partículas empleando dos trampas. Se comprobó que, cuando las trampas ópticas se encuentran situadas a una distancia del orden del tamaño de la partícula, ambas pueden actuar simultáneamente sobre ésta, lo que permite manipular la partícula en una nueva dirección del espacio.

5.2b- Partículas en forma de disco.

Se estudiaron partículas en forma de disco hexagonal con 400 nm de grosor y 800 nm de diámetro (muestra II). En la **Figura 5.17a** se puede ver una imagen SEM de la muestra. Al igual que en el estudio de las partículas cilíndricas, una dispersión acuosa diluida (2.3×10^7 partículas/ cm^3) se introdujo en un microcanal donde el haz de atrapamiento fue focalizado empleando un objetivo 100X de apertura numérica 0.85.

Resultados.

Una vez una partícula fue atrapada, se midió su espectro de emisión polarizado. En la **Figura 5.17b** se muestran dos espectros de emisión medidos para dos estados de polarización ortogonales. Los picos de interés se encuentran centrados en torno a 656 y

664 nm. El espectro morado corresponde a un estado de polarización paralelo a la polarización del láser, mientras que el espectro verde se obtuvo para un estado de polarización perpendicular al vector campo eléctrico del haz de atrapamiento. Se puede ver que la forma espectral de la emisión es distinta. El espectro morado corresponde al estado de polarización π , mientras que el verde tiene la forma espectral de aquéllos obtenidos para el estado de polarización α (ver **Figura 5.11b-c**). La detección de estos dos estados de polarización indica que las partículas en forma de disco se orientan con su cara hexagonal paralela al haz de atrapamiento (orientación vertical, ver **Figura 5.9b**). Una vez en la orientación vertical, la partícula se coloca con su eje óptico paralelo al vector del campo eléctrico del láser de atrapamiento. Este hecho se concluye al observar que el espectro de emisión detectado a lo largo de la polarización del láser coincide con el espectro asociado al estado de polarización π , en el que la luz se propaga perpendicularmente al eje óptico con polarización paralela a él. La orientación final de la partícula dentro de la trampa respecto a la polarización del láser está esquemáticamente representada en la **Figura 5.17c**.

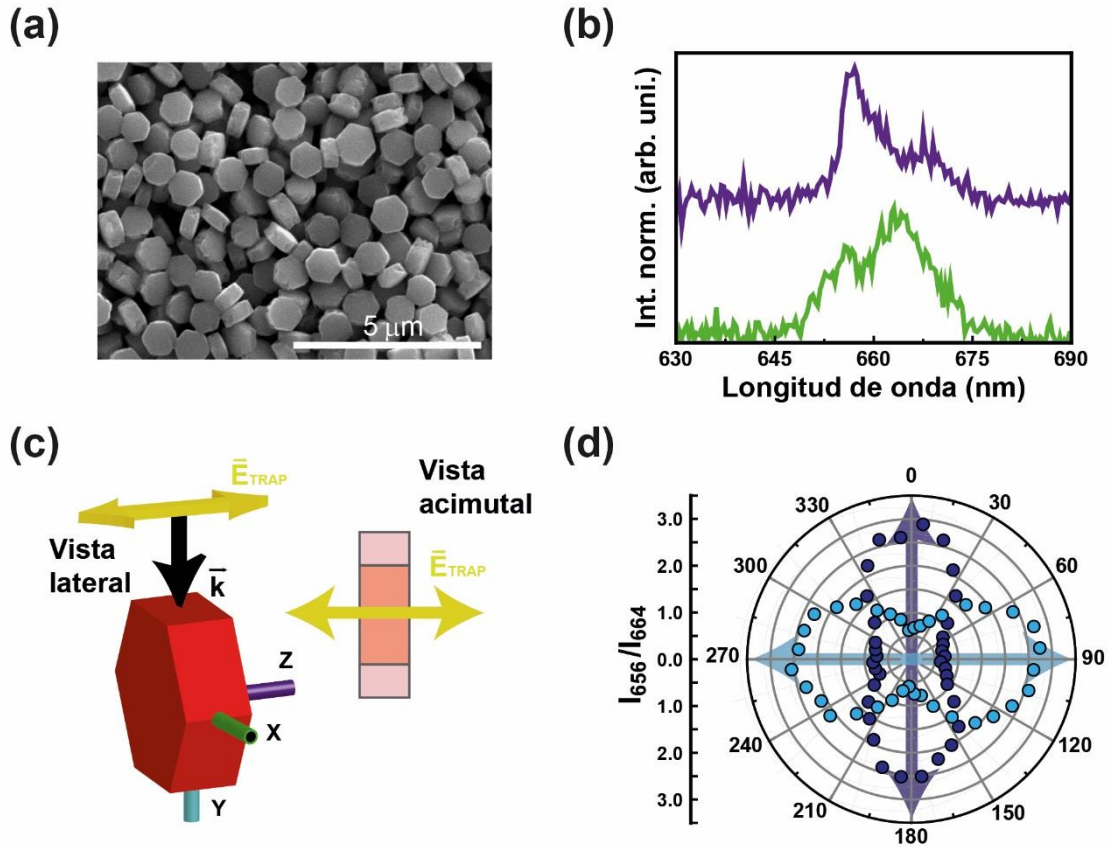


Figura 5.17. Espectroscopía polarizada de una partícula en forma de disco ópticamente atrapada. (a) Imagen SEM de la muestra. (b) Espectros de emisión para dos estados de polarización ortogonales: uno paralelo (morado) y otro perpendicular (verde) a la polarización del láser de atrapamiento. (c) Representación esquemática de la orientación de la partícula cuando es atrapada. Se indican la dirección de propagación del haz de atrapamiento (\vec{k}) y su polarización (\vec{E}_{TRAP}). (d) Diagramas polares del cociente de intensidades para dos orientaciones ortogonales de la polarización del láser. Se indica con flechas la dirección de polarización del haz de atrapamiento en ambos casos.

Para concluir de manera inequívoca que la partícula se orienta con su eje óptico paralelo al vector de campo eléctrico del haz de atrapamiento, se midieron los diagramas polares del cociente de intensidades (I_{656}/I_{664}) para dos estados de polarización ortogonales del haz de atrapamiento. Los resultados están recogidos en la **Figura 5.17d**. Se puede ver que una rotación de 90° en la polarización del láser se traduce en un giro de 90° en el diagrama polar de I_{656}/I_{664} . Estos resultados confirman que las partículas se orientan con su eje óptico paralelo a la polarización del láser, independientemente de la orientación de ésta.

Aunque únicamente se hizo un estudio exhaustivo de las partículas de 400 nm de grosor y 800 nm de diámetro, se comprobó que los resultados aquí obtenidos son independientes del tamaño de la partícula. Se estudiaron tres tamaños más: (diámetro x grosor) 3×1.6 , 2×0.7 y $1.5 \times 0.5 \mu\text{m}$. En todos los casos las partículas se orientaban con su eje óptico paralelo a la polarización de láser.

Discusión y análisis teórico.

Los resultados experimentales demuestran la existencia de dos torques ópticos actuando sobre la partícula, pero no permiten determinar el mecanismo físico que se encuentra detrás de ellos. Para entender mejor el problema, se realizaron simulaciones numéricas de la interacción entre el campo electromagnético y la partícula atrapada empleando el método de elementos finitos.[10] El valor de ambos torques se calculó usando la expresión 2.16. Las simulaciones se realizaron para una partícula no birrefringente en forma de disco hexagonal, de 400 nm de grosor y 800 nm de diámetro iluminada por una onda plana de 980 nm de longitud de onda polarizada linealmente.

Los dos torques observados experimentalmente son el torque axial y el radial. Cada uno de ellos se va a analizar por separado.

Torque axial.

Este torque induce una rotación de la partícula en torno a un eje perpendicular a la dirección de propagación del láser (definida por \vec{k}). Debido a la acción de este torque la partícula se orienta con su eje óptico perpendicular a la dirección de propagación del láser (configuración vertical). La posición de equilibrio se da cuando \vec{k} y el eje óptico de la partícula forman un ángulo de $\theta = 90^\circ$.

La rotación inducida por el torque axial está ilustrada en la **Figura 5.18a**. Tal y como está definida la incidencia del campo electromagnético en la partícula, existen dos rotaciones posibles. En la primera (esquema superior de la **Figura 5.18a**), el eje de rotación es paralelo al campo eléctrico del haz de atrapamiento (eje x) y, en la segunda (esquema inferior de la **Figura 5.18a**), el eje de rotación es paralelo al campo magnético (eje y). La rotación en torno al campo eléctrico está caracterizada por el ángulo θ_E , mientras que la rotación en torno a la dirección del campo magnético está definida por el ángulo θ_H . Cada una de las rutas da lugar a una orientación final distinta del eje óptico de la partícula respecto a la dirección de polarización del láser. En la rotación en torno al campo eléctrico, el eje óptico queda perpendicular al vector campo eléctrico del haz, mientras que en el giro en torno al campo magnético, el eje óptico queda paralelo a la polarización del láser de atrapamiento.

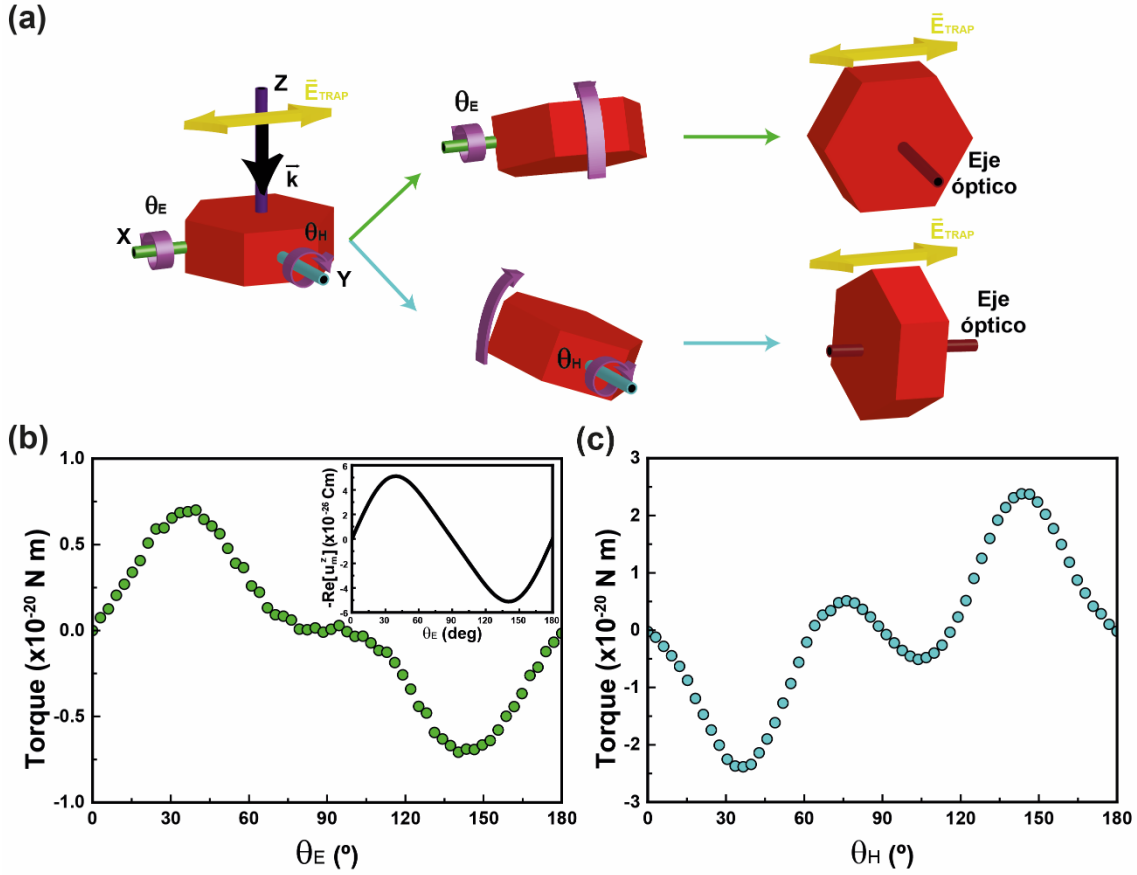


Figura 5.18. Torque axial. (a) Posibles rutas a través de las que se puede alcanzar la posición de equilibrio. Ruta superior (verde), la rotación se genera en torno al eje paralelo al campo eléctrico (eje x). Ruta inferior (azul), la rotación se produce en torno a la dirección del campo magnético (eje y). (b) Torque calculado para la rotación en torno a la dirección del campo eléctrico. Recuadro: menos un medio de la parte real del momento magnético en función del ángulo de rotación. (c) Torque calculado para la rotación en torno a la dirección del campo magnético.

En cualquiera de las rotaciones descritas, la posición de equilibrio se da cuando el valor del torque es nulo y su primera derivada es negativa. Esta segunda condición asegura que, cuando la partícula se desvíe de su posición de equilibrio, aparezca un torque de sentido contrario a la rotación que devolverá a la partícula a la orientación estable. En ambos giros se obtiene una orientación de equilibrio para $\theta = 90^\circ$, como puede verse en la **Figura 5.18b-c**. Sin embargo, para el giro en torno al campo magnético, también se obtiene una orientación de equilibrio para $\theta_H = 0^\circ$ (ver **Figura 5.18c**). Esto implica que la ruta más probable de giro es la que implica una rotación en torno a la dirección del campo eléctrico (**Figura 5.18b**), ya que ésta presenta un punto de no equilibrio en $\theta_E = 0$. Esta rotación da como resultado que la partícula quede orientada con su eje óptico perpendicular a la polarización de láser. Este hecho no está de acuerdo con la orientación final de la partícula observada experimentalmente, lo que sugiere la existencia de un segundo torque que actúa sobre la partícula una vez que ésta alcanza la orientación vertical. Éste es el denominado torque radial que se describirá más adelante.

Para entender un poco mejor el fenómeno físico que se encuentra detrás de la rotación producida por el torque axial, se estudió el caso en el que la partícula se comporta

principalmente como un dipolo eléctrico y otro magnético al ser iluminada por una onda plana (ver sección 2.1c, expresión 2.17). La situación de la **Figura 5.18** corresponde a una onda plana que se propaga a lo largo del eje z con polarización paralela al eje x. El torque generado en este caso viene únicamente determinado por la componente z del dipolo magnético (u_m^z):

$$\Gamma = -\frac{1}{2}\Re[u_m^z c B^*]\hat{x} \quad (5.2)$$

Donde \hat{x} es un vector unitario en la dirección x. En el recuadro de la **Figura 5.18b** está representado el valor calculado de $-\frac{1}{2}\Re[u_m^z]$ en función del ángulo de polarización. Este gráfico predice que existe una posición de equilibrio para $\theta_E = 90^\circ$. Este resultado está de acuerdo con el cálculo teórico del torque axial presentado en la **Figura 5.18b** y con los resultados experimentales obtenidos, lo que indica que la rotación axial se produce principalmente por la interacción entre la radiación de atrapamiento y el momento magnético de la partícula.

Torque radial.

Una vez en la configuración vertical, el torque radial es el responsable de inducir una rotación alrededor del eje de propagación del haz láser (eje z) hasta que se alcanza la orientación estable para $\varphi = 90^\circ$. El ángulo φ está definido como el que se forma entre el vector campo eléctrico del láser y la dirección perpendicular al eje óptico de la partícula.

La rotación inducida por el torque radial está ilustrada en la **Figura 5.19a**. Los valores numéricos calculados para el torque radial (ver **Figura 5.19b**) muestran que la orientación estable se da para $\varphi = 90^\circ$, por lo que se concluye que la partícula rota hasta que su eje óptico queda paralelo a la polarización de láser. Este resultado está de acuerdo con las observaciones experimentales.

Igual que se hizo para el torque axial, se calculó el valor del torque radial en la aproximación dipolar para la situación representada en la **Figura 5.19a**. En este caso, el torque depende tanto de la componente x del dipolo magnético (u_m^x) como de la componente y (u_e^y) del dipolo eléctrico:

$$\Gamma = -\frac{1}{2}\Re[u_m^x c B^* + u_e^y E^*]\hat{z} \quad (5.3)$$

Donde \hat{z} es un vector unitario en la dirección z. En la **Figura 5.19c** se muestra la dependencia con el ángulo de rotación de la parte real de las componentes x e y de los dipolos magnético (negro) y eléctrico (rojo), respectivamente. La componente dominante procede del dipolo magnético, que es dos órdenes de magnitud mayor que la del dipolo eléctrico. Además, puede verse que el valor de la componente magnética establece una orientación de equilibrio para $\varphi = 90^\circ$, de acuerdo con las observaciones experimentales y los resultados numéricos (**Figura 5.19b**). Por el contrario, el valor de la componente y del campo eléctrico predice una situación estable para $\varphi = 0^\circ$, lo que no se ajusta a lo obtenido experimentalmente.

Estos resultados permiten concluir así que la rotación producida por el torque axial es principalmente debida a la interacción entre la radiación de atrapamiento y el momento dipolar magnético de la partícula.

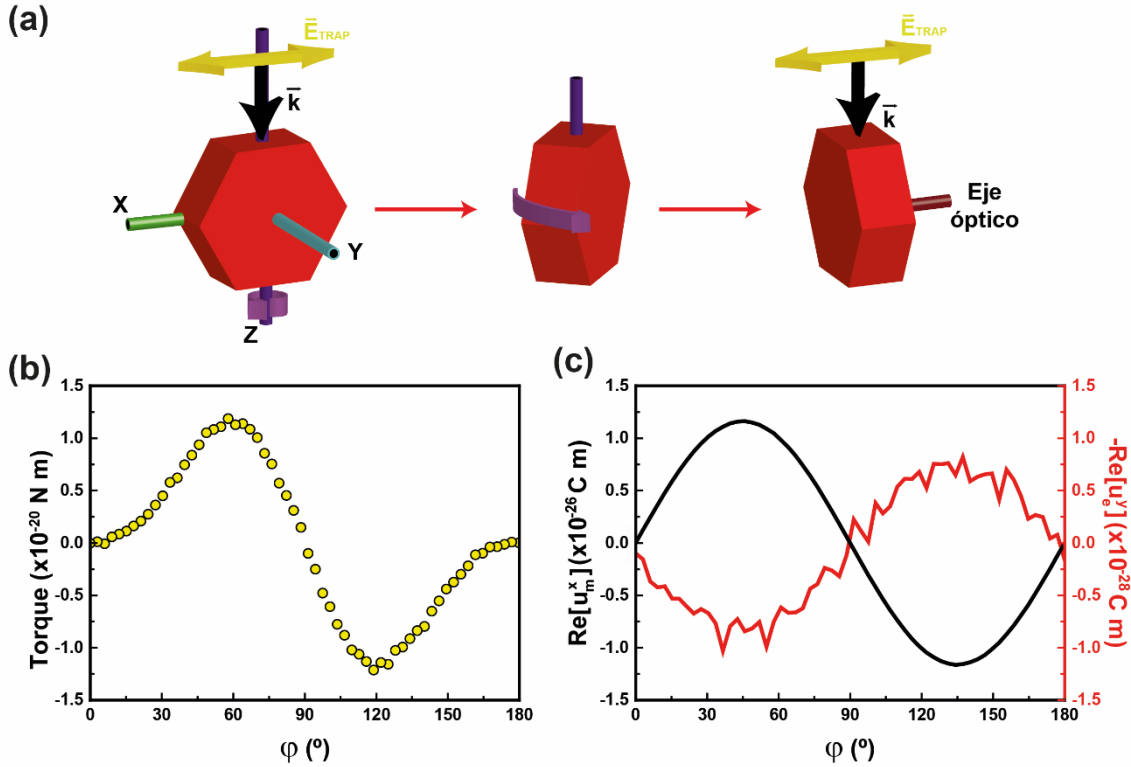


Figura 5.19. Torque radial. (a) Representación de la rotación alrededor del eje paralelo a la dirección de propagación de haz láser. (b) Valor del torque calculado en función del ángulo de rotación (c) Parte real de la componente x del dipolo magnético (negro) y de la componente y del dipolo eléctrico (rojo) en función del ángulo de rotación.

Conclusiones:

Los resultados experimentales muestran que las partículas en forma de disco se orientan con su eje óptico paralelo a la polarización del haz de atrapamiento. Estas observaciones se corroboraron a través del cálculo teórico de los valores de los torques que actúan sobre la partícula. Se distingue un torque radial que induce una rotación de la partícula que hace que realice una transición desde la orientación horizontal a la vertical. Una vez en esa configuración, un segundo torque actúa de tal manera que la orientación estable final de la partícula es aquella que hace coincidir su eje óptico con la polarización del láser de atrapamiento. Por último, se calculó el valor del torque para el caso simplificado en el que la partícula se comporta como un dipolo magnético y eléctrico. Se vio que, en ambos torques, la contribución fundamental a la rotación procede del dipolo magnético de la partícula.

5.3- Influencia de las características de la nanopartícula en la fuerza óptica.

En la sección 2.1b se analizó la teoría que describe las fuerzas ópticas que actúan sobre nanopartículas. Ésta establece que la magnitud de las fuerzas está directamente relacionada con el tamaño de la partícula a través de su polarizabilidad (α_{NP}). Sin embargo, α_{NP} depende no solo del volumen de partícula sino también de las características electrostáticas de su superficie (expresión 2.8). Teniendo esto en cuenta,

la fuerza que actúa sobre la nanopartícula puede verse afectada por la modificación tanto de su tamaño como de sus características electrostáticas. En este sentido, surge la siguiente pregunta: *¿cuál de los dos parámetros, volumen o características electrostáticas, será el que domine en la determinación de las fuerzas ópticas sobre nanopartículas?* Para buscar una respuesta a esta pregunta se analizó la eficiencia de atrapamiento de tres muestras de nanopartículas distintas. El parámetro conocido como potencial zeta (ver sección 4.2d) puede emplearse para caracterizar las propiedades electrostáticas de la partícula. De esta manera, se estudiaron muestras con volumen y valor de potencial zeta distintos:

- 1- *Muestra A*: Partículas de tamaño fijo y potencial zeta variable.
- 2- *Muestra B*: Partículas de tamaño variable y potencial zeta constante.
- 3- *Muestra C*: Partículas de tamaño y potencial zeta variables.

En la **Tabla 5.2** se recogen los valores de los parámetros que caracterizan las distintas partículas. La muestra A está compuesta por partículas de $\text{SrF}_2:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ de 8 nm de diámetro (muestra III, ver sección 4.1b). Su potencial zeta fue modificado empleando el procedimiento descrito en la sección 4.1d. Mediante la medida del radio hidrodinámico de las partículas se comprobó que el proceso de variación del potencial zeta no había modificado su tamaño.

La muestra B está formada por partículas compuestas por un núcleo de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ recubierto por una capa de sílice de grosor variable (muestra I). Estas partículas presentan un potencial zeta casi constante, independiente del tamaño.

| Muestra | Geometría | Tamaño (nm) | | Diámetro hidrodinámico (nm) | Potencial zeta (mV) |
|---------|-----------|---------------|------------|-----------------------------|---------------------|
| | | Diámetro | Grosor | | |
| A | Esfera | 8 ± 3 | --- | 8 ± 4 | -21 ± 4 |
| A | Esfera | 8 ± 3 | --- | 8 ± 4 | -26 ± 3 |
| A | Esfera | 8 ± 3 | --- | 8 ± 4 | -29 ± 4 |
| A | Esfera | 8 ± 3 | --- | 8 ± 4 | -28 ± 4 |
| A | Esfera | 8 ± 3 | --- | 8 ± 4 | -35 ± 3 |
| A | Esfera | 8 ± 3 | --- | 8 ± 4 | -34 ± 4 |
| B | Esfera | 55 ± 2 | --- | 87.8 ± 0.1 | -24 ± 3 |
| B | Esfera | 69 ± 2 | --- | 94.6 ± 0.1 | -32 ± 3 |
| B | Esfera | 88 ± 3 | --- | 109.3 ± 0.1 | -25 ± 3 |
| B | Esfera | 117 ± 3 | --- | 137.0 ± 0.1 | -32 ± 4 |
| C | Esfera | 8.0 ± 0.4 | --- | 41 ± 7 | 28 ± 3 |
| C | Esfera | 20 ± 2 | --- | 47 ± 7 | 29 ± 2 |
| C | Esfera | 31 ± 8 | --- | 67 ± 13 | 30 ± 2 |
| C | Disco | 49 ± 8 | 31 ± 5 | 80 ± 13 | 35 ± 2 |
| C | Disco | 82 ± 8 | 57 ± 4 | 120 ± 20 | 40 ± 3 |
| C | Disco | 100 ± 5 | 69 ± 5 | 140 ± 23 | 38 ± 5 |
| C | Disco | 148 ± 7 | 87 ± 3 | 178 ± 27 | 47 ± 5 |
| C | Disco | 196 ± 8 | 5* | 197 ± 24 | 41 ± 4 |

Tabla 5.2 Caracterización de las muestras estudiadas. Se incluyen los tamaños obtenidos de imágenes de TEM y los valores medidos del diámetro hidrodinámico y el potencial zeta. *Valor estimado.

Por último, la muestra C está compuesta por partículas de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ (muestra V) de diferentes tamaños. En este caso, el valor de potencial zeta aumenta con el volumen de la partícula.

Se midió la eficiencia de atrapamiento para cada una de las muestras presentadas en la **Tabla 5.2**. Para ello se empleó el método hidrodinámico lineal de la velocidad de escape (ver sección 2.2a). En la sección 4.2c se explicó que el coeficiente de rozamiento, necesario para la medida de la fuerza por este procedimiento, depende de la geometría de la partícula. En este caso, para todas las partículas, se asumió una geometría esférica con radio igual al radio hidrodinámico medido, ya que éste representa el tamaño efectivo que ofrece la partícula cuando se está desplazando en el fluido.

Resultados.

Para comparar la dependencia de la fuerza de atrapamiento con las características de la partícula, se hicieron representaciones de los valores medidos para la constante de atrapamiento (K_r) en función de los dos parámetros de interés: el volumen y potencial zeta (ver **Figura 5.20**). Los valores obtenidos para K_r concuerdan en orden de magnitud con los anteriormente publicados por otros autores para nanopartículas dieléctricas de tamaños semejantes.[11, 12]

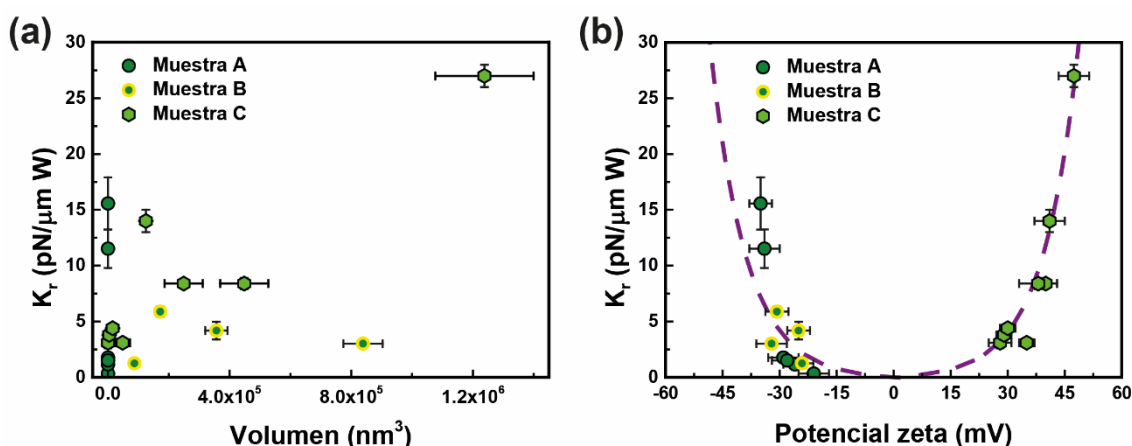


Figura 5.20 Constante de atrapamiento en función de las características de la partícula. (a) Valores medidos de la constante de atrapamiento (K_r) en función del volumen de la partícula. (b) Valores de K_r en función del potencial zeta. La línea discontinua es el mejor ajuste de la expresión 5.4.

En la **Figura 5.20a** se muestran los valores de K_r en función del tamaño de partícula. Como se ha mencionado anteriormente, la teoría establece que la fuerza de atrapamiento debe aumentar linealmente con el volumen de la partícula. Los resultados globales obtenidos para el conjunto de las tres muestras no presentan esa tendencia. La muestra C sí proporciona, en términos generales, valores crecientes de K_r al aumentar el volumen de la partícula. Sin embargo, algunos datos se desvían de esta tendencia un valor mayor que el asociado al error experimental. Por otro lado, para partículas con un mismo volumen (muestra A), la fuerza de atrapamiento no es constante alcanzándose una diferencia mayor de 15 $\text{pN}/\mu\text{m W}$ entre el valor menor y el mayor, muy por encima del error experimental de la medida. Finalmente, las partículas pertenecientes a la muestra B

presentan valores de K_r independientes del tamaño de partícula: el aumento de casi 10 veces en el volumen no queda reflejado en el valor de K_r .

La **Figura 5.20b** presenta los valores medidos de K_r en función del valor de potencial zeta. En este caso sí que se aprecian dos tendencias. Para valores de potencial zeta cercanos o menores que 30 mV (en valor absoluto) la fuerza de atrapamiento permanece más o menos constante independientemente del tamaño de la partícula. Cuando el valor absoluto del potencial zeta es mayor que 30 mV, K_r aumenta abruptamente.

Discusión.

A lo largo de los años se han publicado diferentes trabajos sobre la dependencia de la fuerza de atrapamiento con el tamaño de la partícula. Aquellos centrados en el intervalo nanométrico mayoritariamente tratan sobre partículas metálicas y sus resultados no pueden aplicarse a este estudio.[13, 14] Por otro lado, los trabajos dedicados a partículas dieléctricas únicamente estudian tamaños comparables o mayores que la longitud de onda (desde cientos de nanómetros a decenas de micras).[15-19] Por el momento no se ha realizado ningún estudio para partículas dieléctricas con tamaños menores que 200 nm como el que se presenta en esta tesis. Sin embargo, sí existen trabajos en ese intervalo de tamaños para partículas semiconductoras. Jauffred y Oddershede estudiaron las fuerzas ópticas ejercidas sobre puntos cuánticos (*quantum dots*) de diámetros comprendidos entre 10 y 30 nm.[20] Concluyeron que en ese intervalo de tamaños la fuerza es independiente del volumen de la partícula. Estos resultados y los presentados en esta tesis doctoral (**Figura 5.20a**) evidencian que, en el caso de partículas no metálicas (dieléctricas y semiconductoras) de tamaño menor a 200 nm, el volumen no es el parámetro determinante de las fuerzas ópticas.

Una vez que el volumen ha sido descartado como característica dominante en la determinación de las fuerzas ópticas, debe analizarse el papel que cumplen las propiedades electrostáticas de la partícula empleando el potencial zeta. En la sección 4.2d se explicó que incluso las partículas desnudas (sin recubrimiento) presentan una “nube de carga” a su alrededor. Ésta se crea entre la superficie de la partícula y el medio que la rodea y se organiza en una doble capa. Esta distribución de carga afecta a las propiedades electrostáticas de la partícula, más concretamente a su polarizabilidad (expresión 2.8), que determina la fuerza óptica (caracterizada en este caso por K_r) que actúa sobre la nanopartícula (expresión 2.9). En una primera aproximación se puede establecer que la polarizabilidad de la nanopartícula (α_0) está gobernada por la polarizabilidad electrónica de la doble capa (α_{EDL}). El valor exacto de α_{EDL} no se conoce y no se han encontrado trabajos que lo establezcan. Sin embargo, en una primera aproximación, en esta tesis se propone que se puede considerar que α_{EDL} es proporcional a la carga de la partícula dada por la expresión 4.7. Empleando esta nueva polarizabilidad tenemos que la constante de atrapamiento será proporcional al potencial zeta de la partícula:

$$K_r \propto \alpha_0 \propto \alpha_{EDL} \propto \sinh\left(\frac{e\zeta}{2E_r}\right) \quad (5.4)$$

En la **Figura 5.20b** se ha incluido el ajuste a la expresión 5.4, que proporciona un valor de $E_r = 5e \text{ mV}$. Este valor es menor que el propuesto ($E_r \approx k_B T \approx 25 e \text{ mV}$, ver sección

4.2d). Sin embargo, la tendencia de los datos experimentales queda bien representada por la función seno hiperbólico de la expresión 5.4.

Conclusiones.

Los resultados obtenidos evidencian el papel principal que tienen las propiedades electrostáticas frente al volumen en la determinación de las fuerzas ópticas que actúan sobre las nanopartículas de tamaños comprendidos entre los 8 y 200 nm. Este hecho abre una puerta al diseño de nanopartículas cuyas características electrostáticas pueden aumentar la fuerza de atrapamiento.

5.4- Medidas térmicas a nivel celular.

Los tratamientos térmicos permiten dañar células de manera controlada cuando la temperatura se eleva por encima de un umbral, en torno a 45 °C, a partir del cual se desencadenan una serie de mecanismos biológicos que dan lugar a la muerte celular. Este tipo de tratamientos requieren un control preciso de la temperatura con el fin de minimizar los daños producidos en la región que rodea a la célula tratada, así como generar procesos controlados y reproducibles en los que se controle el efecto final causado.

En esta sección se muestra cómo es posible determinar la temperatura a escala celular mediante el uso de partículas de *upconversion* ópticamente atrapadas.

Resultados.

Calibración térmica de la micropartícula.

Se emplearon partículas en forma de disco de 3 μm de diámetro y 1.5 μm de grosor compuestas por una matriz de NaYF_4 dopadas con iones de Er^{3+} e Yb^{3+} (muestra II). Como se vio en la sección 3.5a, los iones de Er^{3+} son buenos agentes medidores de temperatura, por lo que pueden emplearse como termómetros. Su sensibilidad térmica proviene de la intensidad relativa entre las bandas de emisión asociadas a las transiciones $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ y $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (ver **Figura 5.21a**) centradas en torno a 525 y 550 nm, respectivamente, que se encuentran acopladas térmicamente.

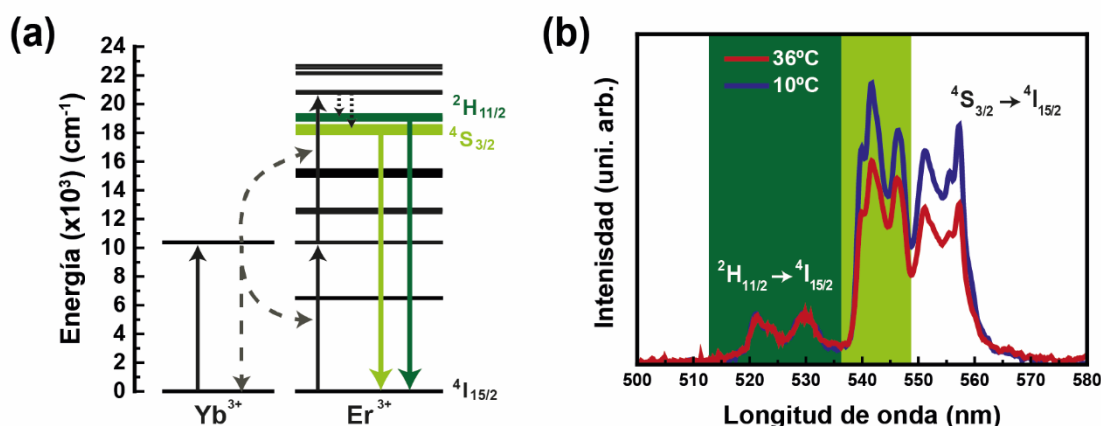


Figura 5.21 Termometría basada en iones de Er^{3+} . (a) Esquema de niveles del sistema Er/Yb en el que se indican las emisiones de interés. (b) Espectros de emisión obtenidos a dos temperaturas distintas del sistema.

Para poder emplear las partículas como sensores térmicos, primero es necesario obtener la denominada curva de calibración, que permite obtener la relación entre el cociente de intensidades y la temperatura (ver sección 3.5a). Para ello se introdujo una dispersión diluida de partículas (2×10^6 partículas/cm³) en el interior de un microcanal y se midió el espectro de emisión de partículas aisladas para diferentes temperaturas del medio circundante (ver sección 4.2a para más detalles experimentales). En la **Figura 5.21b** se representan dos espectros de emisión obtenidos a 10 y 36 °C. Puede verse claramente que, al aumentar la temperatura, la intensidad de emisión asociada a la transición $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ disminuye respecto a la producida por la transición $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$. El cambio en las intensidades relativas de estas dos bandas se debe a la redistribución térmica de las poblaciones electrónicas de los niveles (ver sección 3.5a). Al elevar la temperatura, la población del nivel $^2H_{11/2}$ se incrementa respecto a la del nivel $^4S_{3/2}$, lo que hace que la intensidad de emisión asociada a la transición $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ aumente respecto a la asociada a la transición $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$. Este cambio en el cociente de intensidades (I_{525}/I_{550}) de las bandas es el empleado para la medida de la temperatura.

La **Figura 5.22** recoge la curva de calibración medida para una única partícula. Se estudió la evolución de la intensidad de las áreas indicadas en la **Figura 5.21b**. Se empleó la banda completa asociada a la transición $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$. Sin embargo, para intentar minimizar el efecto de las emisiones secundarias que dan lugar a radiación en tono a 557 nm (ver sección 5.1a), se integró únicamente la mitad de la banda $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$. Se comprobó experimentalmente que la integración completa de la banda no permitía obtener una tendencia clara de la emisión en función de la temperatura, sin embargo, el cociente de intensidades seguía una tendencia lineal (ver **Figura 5.22**) cuando se excluía la parte derecha de la banda centrada en torno a 550 nm. La sensibilidad estimada (ver sección 3.5a) a partir de la recta de calibración es de $1.3 \times 10^{-2} \pm 0.6 \times 10^{-2} \text{ K}^{-1}$ a 38 °C. Su valor es comparable al obtenido para otros sistemas de Er/Yb.[21]

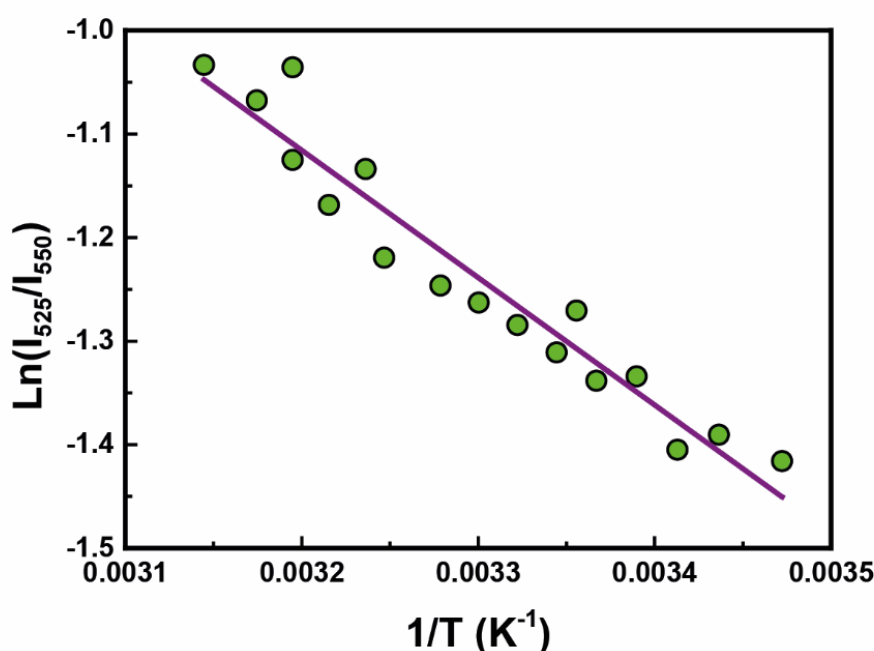


Figura 5.22 Curva de calibración. Fue obtenida bajo excitación de 980 nm a una potencia de 13 mW ($6 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$).

La resolución espacial viene determinada por el tamaño de la partícula empleada. La temperatura medida a través del espectro de emisión es el promedio de la que detecta cada uno de los iones de Er^{3+} que componen la partícula. Por esta razón, se asume que no se puede realizar una medida térmica con una resolución por debajo del tamaño de la partícula. El error espacial estimado es de $1.5 \mu\text{m} \approx 2 \mu\text{m}$. Por otro lado, se estimó un error en la medida de la temperatura de 1°C para una potencia de 13 mW ($6 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$), según se explica en la sección 3.5a.

Medida del gradiente térmico: experimento preliminar.

Una vez obtenida la curva de calibración de las partículas-termómetro, se procedió a realizar un experimento previo para determinar la eficacia del sistema de medida. Se estudió el gradiente térmico generado por la focalización de un haz láser de 1450 nm en el interior de un microcanal de $100 \mu\text{m}$ de altura que contenía la dispersión acuosa de partículas. El objetivo empleado para focalizar ese haz tenía una apertura numérica de 0.25 y estaba situado en la parte inferior del microcanal, tal y como se describe en la sección 4.2a.

La radiación de 1450 nm es parcialmente absorbida por el agua (ver **Figura 5.23a**), lo que da lugar a un incremento de la temperatura en las proximidades del foco (ver recuadro **Figura 5.23a**). En la **Figura 5.23b** se muestra la variación de la temperatura respecto al centro del foco de calentamiento. Para la medida del gradiente térmico se atrapó ópticamente una partícula-termómetro y se trasladó a lo largo del foco de calentamiento. Se realizaron desplazamientos de $5 \mu\text{m}$ (mayores que la resolución espacial) y se midió el espectro de emisión en cada paso. Posteriormente se obtuvo la medida del cambio en la temperatura empleando la recta de calibración de la **Figura 5.22**. En la **Figura 5.23b** Se puede ver que, al aumentar la distancia respecto al foco, la temperatura disminuye. A una distancia de aproximadamente $500 \mu\text{m}$ el incremento de temperatura debido al haz láser es despreciable. Esta disminución del incremento de la temperatura con la distancia es debido a la disipación del calor a lo largo del volumen de agua y las paredes del canal.

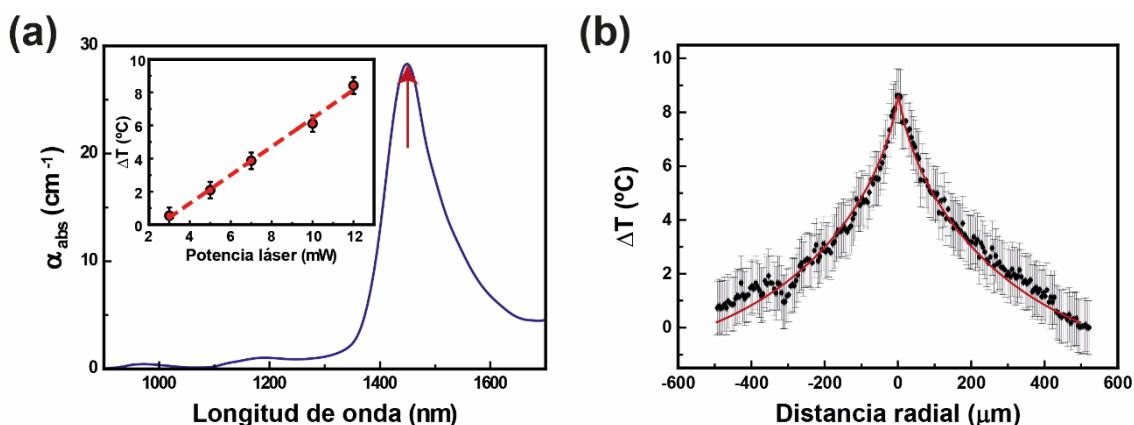


Figura 5.23 Gradiente térmico en torno a un foco de 1450 nm . (a) Espectro de absorción del agua. Se indica la absorción a 1450 nm . Recuadro: incremento de la temperatura en el foco del haz de 1450 nm en función de la potencia aplicada. (b) Gradiente térmico medido empleando una partícula ópticamente atrapada.

La extensión del gradiente térmico se define en esta tesis como la distancia respecto al foco a la que el incremento térmico decae a la mitad. La extensión del gradiente depende de la geometría de la fuente de calor. Para el caso de una fuente cilíndrica, la dependencia del gradiente ($\Delta T(r)$) con la distancia respecto a la fuente (r) puede modelizarse empleando la expresión:[22]

$$\Delta T(r) = \Delta T(0) \ln\left(\frac{Dim}{R_f + r}\right) \quad (5.5)$$

Donde $\Delta T(0)$ es el incremento máximo de temperatura que se da en el límite de la fuente de calor cuyo radio es R_f . Para la apertura numérica empleada, el radio del haz de calentamiento es $R_f \approx 3 \mu m$. Dim representa la dimensión característica del medio que está siendo calentado. En este caso es la altura del microcanal ($100 \mu m$). De esta manera, la extensión del gradiente (r_{ext}) generado por el haz láser focalizado será:

$$r_{ext} = \frac{100}{e^{0.5}} - 3 \approx 60 \mu m \quad (5.6)$$

En el experimento realizado, el incremento máximo de aproximadamente $8.5^\circ C$ se reduce a la mitad a una distancia de aproximadamente de $120 \mu m$. Este valor es semejante pero mayor que el calculado teóricamente. Por consiguiente, el modelo teórico predice una disminución de la temperatura con la distancia mayor que la medida. Estas diferencias pueden deberse a que el modelo teórico describe la evolución de la temperatura con la distancia en el plano focal del haz. De tal manera que, si el gradiente medido corresponde a un plano distinto al mencionado, la caída de la temperatura con la distancia será menos abrupta, como es el caso, ya que la fuente de calor se encuentra más alejada.

Los resultados obtenidos en este experimento preliminar mostraron la validez de la técnica, por lo que se procedió a los experimentos celulares.

Medida del gradiente térmico: experimentos *in vitro*.

La terapia fototérmica celular aquí presentada se basa en el aumento de la temperatura mediante la liberación de calor por parte de partículas metálicas previamente interiorizadas por las células. Las partículas metálicas presentan una característica denominada resonancia plasmónica, que consiste en la oscilación colectiva de los electrones del metal debido a la acción de un campo eléctrico externo. Si los electrones se mueven en la superficie que separa el metal con el medio que lo rodea se denomina resonancia plasmónica superficial (*surface plasmon resonance*, SPR).[23] Esta oscilación colectiva tiene una frecuencia característica que dependerá de la forma y el tamaño de la partícula. Cuando la frecuencia de la radiación incidente coincide con la de la SPR, la energía es fuertemente absorbida y después liberada en forma de calor, ya que la eficiencia de luminiscencia de estas nanopartículas es reducida.

Las células HeLa empleadas en estos experimentos fueron incubadas con partículas de oro cilíndricas (*gold nanorods*, GNRs) de dimensiones $15 \times 45 \text{ nm}$ (ver sección 4.4b). Posteriormente a la incubación, se realizaron experimentos de espectroscopía multifotónica para verificar la presencia de los GNRs en el interior de las células (ver anexo D). Para los experimentos de termometría, las células fueron colocadas en el sistema experimental descrito en la sección 4.2a (ver **Figura 5.24a**, arriba). Las

partículas-termómetro fueron incorporadas al medio de las células al comienzo del experimento. Durante los experimentos *in vitro* se emplearon dos fuentes láser (ver **Figura 5.24a**, abajo). La primera de ellas tenía una longitud de onda de 800 nm, que coincidía con la SPR de los GNRs empleados (ver anexo D). Ésta fue focalizada de la misma manera que la radiación de 1450 nm en el experimento preliminar. La segunda constituye el haz de atrapamiento, de longitud de onda de 980 nm, con el que se manipuló a la partícula-termómetro en los alrededores de la célula tratada.

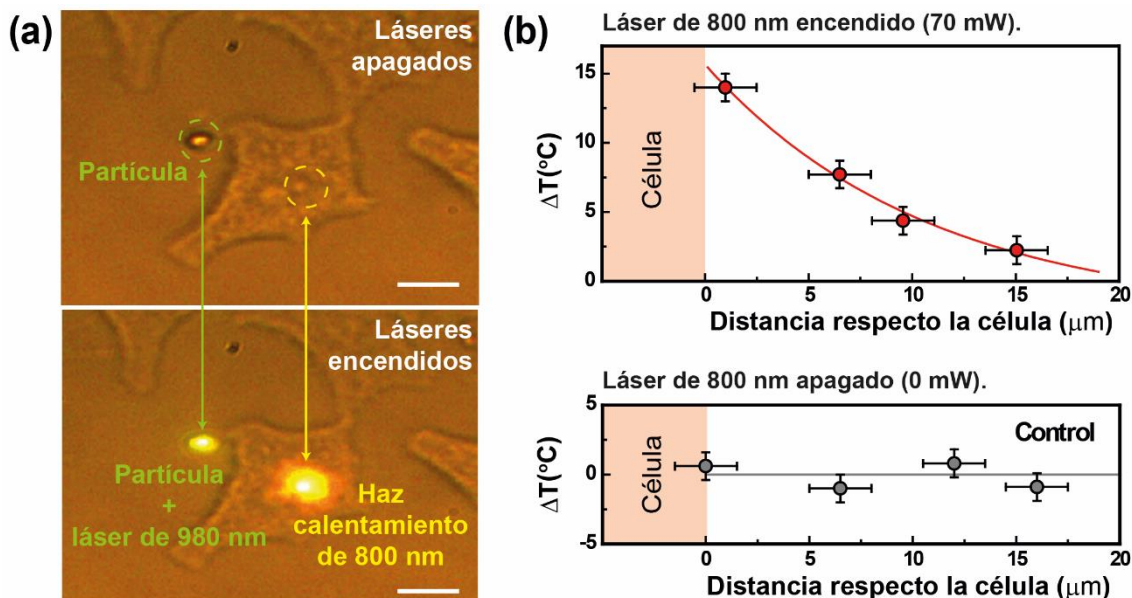


Figura 5.24 Experimentos *in vitro*. (a) Imágenes ópticas de una célula HeLa después de la incubación con GNRs. Se indica la partícula-termómetro y el haz de calentamiento de 800 nm. (b) Arriba: Mapa térmico medido en las inmediaciones de una célula sometida al tratamiento fototérmico. La potencia empleada para el haz de 800 nm es de 70 mW. Abajo: Mapa térmico obtenido para un experimento control donde no se empleó la excitación de 800 nm (potencia láser igual a 0 mW).

El primer paso del procedimiento experimental consistía en la localización de una célula con una partícula-termómetro en los alrededores. Posteriormente se colocaba el haz de calentamiento de 800 nm de tal manera que su foco estuviera situado en la célula a tratar. A continuación se atrapaba la partícula-termómetro. Una vez encendido el haz de calentamiento (ver **Figura 5.24a**, abajo) se comenzaba a desplazar la partícula-termómetro atrapada respecto a la célula.

Mediante el procedimiento descrito se estudió la extensión espacial y la magnitud del gradiente térmico generado en las cercanías de la célula tratada. En la parte superior de la **Figura 5.24b** se muestra el incremento de temperatura medido (respecto a la temperatura ambiente) en función de la distancia radial desde la superficie de la célula tratada. En la parte inferior de la **Figura 5.24b** se muestra el resultado para el experimento control en el que el haz de calentamiento de 800 nm no es encendido. Se puede ver que únicamente aparece un gradiente térmico cuando la SPR de los GNRs es excitada, siendo esta la única fuente de calor apreciable. Es esperable un aumento de la temperatura en la región de la partícula atrapada debido a la absorción parcial de la radiación de 980 nm por parte del medio acuoso (ver **Figura 5.23a**). Sin embargo, este calentamiento, que se estima de 0.6

°C para la potencia láser empleada, es despreciable ya que únicamente añade un valor de fondo que no afecta a la forma del gradiente medido.[24]

Discusión.

Los experimentos realizados han permitido determinar que, al aumentar la temperatura intracelular, existe una disipación del calor generado hacia el exterior de la célula que produce un gradiente térmico que se extiende decenas de micras desde los límites de ésta. Estos resultados eran esperables ya que la membrana celular no es aislante y el calor interior puede difundirse al exterior de la célula.

A diferencia del estudio preliminar, en los experimentos *in vitro* el incremento de la temperatura es producido por las partículas de oro que han sido interiorizadas por la célula. En este caso, los modelos teóricos establecen que el gradiente térmico producido por una partícula (fuente de calor esférica) es inversamente proporcional a la distancia (r) respecto a ésta:[25, 26]

$$\Delta T(r) = \frac{\Delta T(0)}{r/R_f} \quad (5.7)$$

De nuevo, a representa el tamaño de la fuente de calor. Si, en vez de una única nanopartícula, la fuente de calor está compuesta por un conjunto de ellas, a vendrá dado por la extensión que ocupan. En este caso, la fuente de calor tiene el tamaño del foco de excitación de longitud de onda de 800 nm (en torno a 2 μm), ya que únicamente las partículas que absorban la radiación producirán el aumento en la temperatura. El gradiente medido experimentalmente (ver **Figura 5.24b**) tiene una extensión aproximada de 7 μm , semejante al valor estimado empleando el modelo teórico ($r_{ext} = 2R_f = 4 \mu\text{m}$). De esta manera, se puede concluir que el conjunto de GNRs interiorizados por la célula se comporta como una fuente de calor esférica.

Los experimentos realizados evidencian la validez de la técnica desarrollada para la realización de medidas térmicas a nivel celular. Tanto la resolución espacial como la de temperatura son suficientes para caracterizar el gradiente térmico en las proximidades de una célula que está siendo tratada fototérmicamente. Sin embargo, existen diferentes dificultades experimentales que deben ser subsanadas en el futuro con el fin de mejorar la técnica desarrollada.

En primer lugar, cabe destacar que la realización de los mapas térmicos no fue una tarea fácil. El principal problema encontrado fue la adhesión de las partículas al sustrato o a la pared celular. Este fenómeno se atribuye a las interacciones electrostáticas entre la partícula y las superficies. Cuanto más cercana se encontraba la partícula a las superficies, mayor era la probabilidad de que ésta quedara adherida, lo que imposibilitaba su desplazamiento. Se estimó que 4 de cada 5 partículas quedaban adheridas si se empleaban intensidades de potencia cercanas a $6 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$. Este problema podría solucionarse mediante la modificación de la superficie de las partículas. El recubrimiento adecuado puede hacerlas más móviles y permitir que no se adhieran ni a la superficie celular ni al sustrato.

Para una mejora de la resolución espacial puede reducirse el tamaño de la partícula. Sin embargo, si se decrece el tamaño, las fuerzas ópticas también lo harán, por lo que se

deberá realizar un estudio preliminar de las condiciones óptimas de atrapamiento, con el fin de que se pueda mantener la estabilidad de atrapamiento para pequeños tamaños de partícula.

Para mejorar la resolución en temperatura pueden emplearse partículas con una mayor eficiencia de luminiscencia, aunque cabe destacar que las aquí empleadas permitían obtener emisión incluso con potencias del orden de $4 \times 10^4 \text{ W/cm}^2$. También podrían emplearse densidades de potencia mayores para mejorar la relación señal ruido, pero esta estrategia no pudo adoptarse en los experimentos realizados. La necesidad de reducir la potencia de excitación tiene distintas razones. En primer lugar se intentó minimizar el calentamiento producido por la radiación de atrapamiento de 980 nm. Por otro lado, era necesario mantener las emisiones secundarias en torno a 557 nm al mínimo. Por ello no era recomendable emplear intensidades de potencia por encima de $6 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$.

Conclusiones.

La evidencia de la existencia de un gradiente térmico que se extiende decenas de micras en los alrededores de la célula tratada pone de manifiesto la necesidad de controlar la temperatura a tiempo real durante los tratamientos fototérmicos para minimizar los daños indeseados en el tejido circundante. Además, se ha demostrado que el gradiente térmico generado puede describirse en términos de una fuente puntual.

La técnica aquí propuesta y puesta en práctica es una muestra de las capacidades que presenta el atrapamiento óptico. Se ha podido controlar de manera remota una partícula de cuya luminiscencia se ha obtenido una medida de la temperatura. El haz de atrapamiento ha servido tanto para manipular la partícula como para excitar su luminiscencia. Sin embargo, es necesario desarrollar y mejorar la técnica con el fin de poderla implementar para otros usos, no solo los estudios a nivel celular.

5.5- Medida de la viscosidad intracelular: Microreometría.

Las propiedades reológicas (viscosidad, elasticidad y la capacidad de deformación (*creep compliance*)) del citoplasma son determinantes en los procesos que tienen lugar en el interior de las células. Por ejemplo, la viscosidad influye en la velocidad de transporte de las moléculas y orgánulos.[27, 28] Además, estos parámetros son un indicativo del estado celular, por lo que permiten determinar la aparición y evolución de enfermedades.[29]

A lo largo de los años, se han desarrollado múltiples técnicas microreométricas con el fin de medir los diferentes parámetros reológicos.[27, 30, 31] Las más empleadas consisten en monitorizar el movimiento de elementos tanto endógenos (material intracelular) como exógenos (partículas) en el interior celular.[27, 32-35] Algunos autores emplean el análisis de la luminiscencia de partículas o moléculas interiorizadas por las células para medir la viscosidad intracelular.[36-38] Todas estas técnicas se engloban dentro de los métodos pasivos ya que se basan en el análisis de las fluctuaciones térmicas del objeto analizado. Por otro lado, se han desarrollado estrategias de medida en las que la partícula se hace rotar con el fin de imponer una deformación contralada en el medio.[39] Estos son los métodos conocidos como activos.

En esta tesis se han desarrollado dos nuevas técnicas microreométricas para la medida de la viscosidad intracelular basadas en el atrapamiento óptico de micropartículas de *upconversion* y la monitorización de su luminiscencia polarizada.

Descripción de los métodos de medida.

En la sección 5.2b se vio cómo partículas en forma de disco son rotadas por acción del haz de atrapamiento hasta alcanzar su posición estable (orientación vertical) dentro de la trampa (ver diagrama superior en **Figura 5.25a**). La velocidad de rotación de las partículas en un fluido dependerá de las características de éste además de la intensidad de potencia del haz de atrapamiento (magnitud del torque óptico). Como se vio en la sección 2.2a, cuando existe una velocidad relativa entre la partícula atrapada y el medio, aparece una fuerza de rozamiento opuesta al movimiento. De la misma manera, si la partícula gira dentro del fluido, esta fuerza de rozamiento intentará frenarla. Dicha fuerza es proporcional al coeficiente de rozamiento de la partícula, que depende de la viscosidad dinámica del fluido (ver sección 4.2c). Esta relación entre la velocidad de rotación y la viscosidad dinámica del fluido permite obtener información acerca de esta última si se estudia el giro de partículas por acción del haz de atrapamiento. Una vez en la posición vertical, la partícula comenzará a oscilar en torno a la orientación de equilibrio debido al movimiento browniano. Del análisis de estas fluctuaciones se puede obtener también información acerca de la viscosidad del medio, pero, en este caso, de la viscosidad estática, ya que no se está imponiendo una deformación al fluido: la partícula solo se mueve por acción de las fuerzas térmicas.

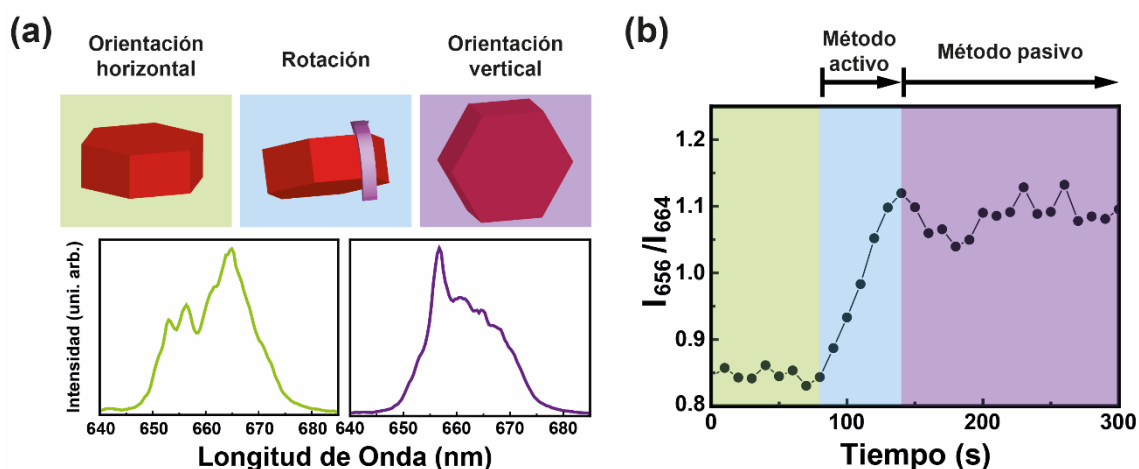


Figura 5.25 Métodos microreométricos. (a) Arriba: Diagrama de la rotación de una partícula por acción del láser de atrapamiento. Abajo: Espectros de emisión de una partícula en forma de disco en las configuraciones horizontal (izquierda) y vertical (derecha). (b) Evolución del cociente de intensidades para una partícula rotando. Se indican los intervalos de datos experimentales empleados para cada uno de los métodos.

Como se vio en la sección 5.2b, la emisión polarizada de partículas en forma de disco puede emplearse para la determinación de su orientación en la trampa óptica. En la **Figura 5.25a** se muestran los espectros de emisión para dos posibles orientaciones de la partícula en la trampa. Como ya se estudió, el cociente de intensidades (I_{656}/I_{664}) entre los picos de emisión centrados en torno a 656 nm y a 664 nm puede emplearse como indicativo de la orientación de la partícula. Se va a emplear esta técnica para monitorizar el giro y la

vibración de partículas en forma de disco. En la **Figura 5.25b** se muestra la evolución de I_{656}/I_{664} para una partícula que rota por acción del haz de atrapamiento. Al comienzo (zona verde) la partícula se encuentra horizontal. En un momento dado, la partícula comienza a rotar (zona azul) hasta que alcanza la orientación estable. Cuando la partícula se encuentra en vertical (zona morada), comienza a fluctuar en torno a la orientación de equilibrio debido al movimiento browniano. Como puede verse, ambas situaciones (rotación de 90° y oscilación) quedan bien caracterizadas a través del valor de I_{656}/I_{664} y cada una de ellas puede emplearse para la medida de la viscosidad del medio empleando dos técnicas microreométricas distintas, que van a explicarse a continuación.

Método activo.

El análisis de la rotación permite determinar, mediante el método activo, la viscosidad dinámica de la célula cuando el citoplasma está sujeto a una deformación (partícula rotando). En este procedimiento de medida se monitoriza el giro completo de 90° desde la orientación horizontal a la vertical (ver diagrama superior en **Figura 5.25a**). Para poder visualizar esa rotación completa, la partícula debe encontrarse al comienzo en la orientación horizontal para luego poder completar una rotación de 90° y alcanzar la orientación vertical.

La viscosidad dinámica (η_d) del medio se relaciona con la velocidad angular de rotación (ω_R) y la intensidad de potencia láser aplicada (I_L) a través de:

$$\eta_d = \frac{\pi \cdot 1.34 \times 10^{-13}}{\omega_R} I_L \quad (5.8)$$

Donde la constante 1.34×10^{-13} tiene en cuenta el valor del torque axial (ver **Figura 5.18b**) y el volumen y geometría de la partícula. El desarrollo matemático completo se encuentra en el anexo E.1. De esta manera, conociendo el valor de la potencia aplicada y midiendo la velocidad angular de rotación de la partícula, se puede obtener un valor de la viscosidad dinámica del medio.

Método pasivo.

En el método pasivo, al igual que en las técnicas de calibración de la trampa óptica, se emplea el análisis de las fluctuaciones térmicas de la partícula atrapada. En este caso, se mide el desplazamiento angular de la partícula en torno a su orientación de equilibrio. Para ello, es necesario que la partícula se encuentre en la orientación vertical (último panel de diagrama superior de la **Figura 5.25a**) para que el movimiento no sea forzado por la acción del láser sino sólo debido al movimiento browniano.

Este procedimiento experimental se basa en el análisis del desplazamiento angular cuadrático medio (*mean square angular displacement*, MSAD) en función del tiempo de muestreo. El desplazamiento angular se obtuvo del análisis del cociente de intensidades. Para más información ver anexo E.2. Del ajuste del valor de MSAD en función del tiempo de muestreo (τ) se puede obtener un valor de la viscosidad estática (η_e) del medio:

$$MSAD(rad^2) = \frac{k_B T}{3 \eta_e V f / f_0} \tau \quad (5.9)$$

Donde V es el volumen de la partícula y f/f_0 es el factor de fricción de Perrin.

Procedimiento experimental.

Para los estudios de microreometría se emplearon partículas en forma de disco de 800 nm de diámetro y 400 nm de grosor (muestra II). Esta muestra es la misma que la empleada para el estudio de la orientación de partículas en forma de disco atrapadas. Por esta razón, el análisis presentado en la sección 5.2b va a emplearse como herramienta para la medida de la viscosidad.

Las células HeLa fueron incubadas con las partículas siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4a. Mediante cultivos a 4 °C se determinó que el mecanismo de incorporación de las partículas era endocitosis (ver anexo F). Tras la incubación, las células se situaron en el sistema experimental descrito en la sección 4.2a. El procedimiento experimental empleado es el siguiente:

Localización de una partícula en el interior celular. En primer lugar se localizó una partícula en el interior de una célula. Para ello se empleó el láser a una potencia suficientemente baja como para no producir la rotación de la partícula, pero capaz de excitar su luminiscencia. Se hicieron escaneos manuales de diferentes células, de tal manera que la emisión de las partículas era excitada cuando el láser se posicionaba sobre ellas, lo que permitía su localización empleando el detector. En la **Figura 5.26** se muestra una imagen óptica de una célula donde se indican dos partículas. Una de ellas se encuentra encima de la membrana celular (partícula externa), mientras que la otra se encuentra en el interior (partícula + láser). Las partículas interiorizadas eran únicamente apreciables cuando se excitaba su luminiscencia (ver **Figura 5.26**), debido a que el contraste de índices de refracción de la partícula con el medio intracelular es pequeño. Sin embargo, las partículas que se encontraban en el exterior de las células sí podían identificarse sin necesidad de excitar su luminiscencia, ya que el contraste de índice de éstas con el medio acuoso de cultivo era mayor.

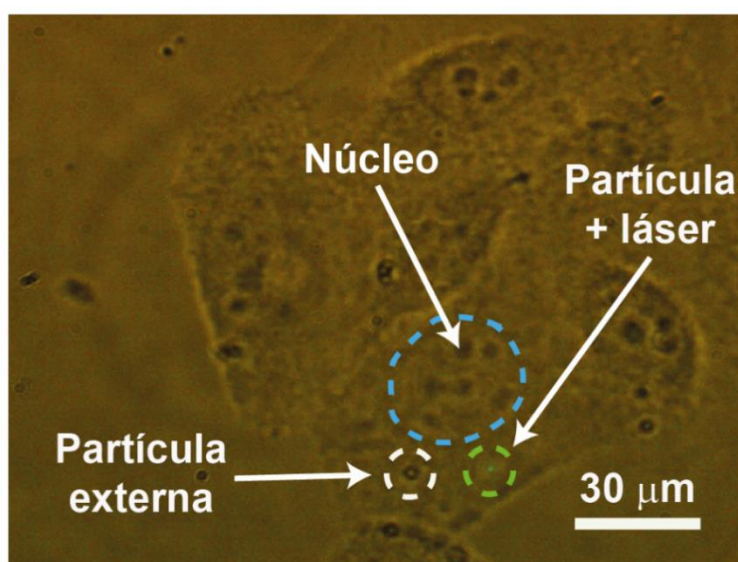


Figura 5.26 Microreometría en células HeLa. Imagen óptica de una célula en la que se indica la presencia de una partícula situada encima de la membrana celular (partícula externa) y una partícula localizada en el interior celular (partícula + láser) que es únicamente detectada gracias a su emisión cuando es excitada por el haz de atrapamiento.

Determinación del método a emplear. Una vez se localizó una partícula interiorizada, se analizó su espectro de emisión. Como se ha comentado, se emplearon dos métodos (activo y pasivo) para la medida de la viscosidad. Cada uno de ellos requiere que la partícula se encuentre en una orientación inicial determinada. Si la partícula localizada se encuentra horizontal, se puede emplear para la medida de la viscosidad dinámica mediante el método activo. Una vez concluida la rotación, puede continuarse la medida empleando el proceso pasivo para el análisis de las fluctuaciones térmicas. Si la partícula se encuentra en un estado intermedio, puede inducirse la rotación para que ésta gire por completo y así pueda emplearse para el procedimiento pasivo.

Medida de la viscosidad. Una vez seleccionadas la célula y la partícula a estudio, se midió el espectro de emisión en función del tiempo. Posteriormente se obtuvo el valor del cociente de intensidades y se analizó de acuerdo con cada uno de los métodos descritos.

Resultados.

Medida de la viscosidad estática: método pasivo.

Se empleó el método pasivo para obtener un valor de la viscosidad intracelular de células HeLa. Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se midieron espectros de emisión consecutivos cada 0.1 s durante un periodo de tiempo total de aproximadamente 10 min para una partícula en posición vertical. A partir de los espectros se obtuvo el valor del cociente de intensidades y, con él, el valor del ángulo. Una vez hecho esto, se calculó el valor del MSAD (anexo E.2). En la **Figura 5.27** se representan los valores de MSAD en función del tiempo de muestreo (gris) obtenidas para un total de 10 partículas localizadas en diferentes células. Del ajuste de cada una de las medidas a la expresión 5.9 se obtuvo un valor para la viscosidad de la célula (**Tabla 5.3**). Se puede ver que existe una dispersión en los valores medidos debida a la variabilidad que presentan las células.[40] Las partículas empleadas para las medidas estaban localizadas en regiones diferentes dentro de distintas células, lo que puede dar lugar a valores distintos de la viscosidad.[28] El valor medio de la viscosidad intracelular, obtenido del valor medio de MSAD (línea negra en **Figura 5.27**), es 2.5 ± 0.5 Pa s.

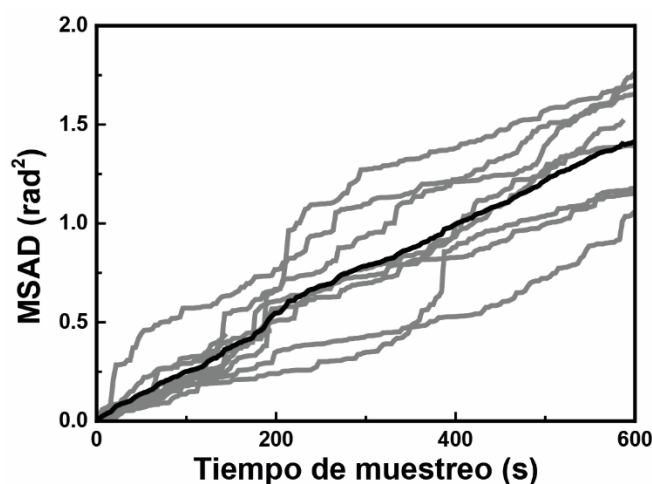


Figura 5.27 Método pasivo. Evolución del desplazamiento angular cuadrático medio (MSAD) con el tiempo de muestreo. Las líneas grises corresponden a medidas individuales mientras que la línea negra corresponde a la media de todas ellas.

| Área dentro de la célula | Intensidad de potencia ($\times 10^{10}$ W/m ²) | Viscosidad (Pa s) |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|
| Lejos de membranas | 1.2 ± 0.2 | 2.13 ± 0.02 |
| Cerca del núcleo | 1.3 ± 0.2 | 2.90 ± 0.03 |
| Cerca del núcleo | 1.3 ± 0.2 | 1.95 ± 0.02 |
| Lejos de membranas | 2.7 ± 0.2 | 2.06 ± 0.06 |
| Cerca del núcleo | 2.7 ± 0.2 | 2.71 ± 0.03 |
| --- | 3.7 ± 0.2 | 1.65 ± 0.04 |
| Muy cerca del núcleo | 4.1 ± 0.2 | 1.98 ± 0.02 |
| Muy cerca del núcleo | 4.1 ± 0.2 | 2.44 ± 0.02 |
| Cerca del núcleo | 4.1 ± 0.2 | 2.80 ± 0.02 |
| Lejos de membranas | 5.9 ± 0.2 | 2.17 ± 0.03 |

Tabla 5.3 Viscosidad estática intracelular. Valores medidos para distintas células empleando el método pasivo.

Medida de la viscosidad dinámica: método activo.

Se realizó un estudio para determinar la viscosidad dinámica en función de la velocidad angular de rotación de la partícula. Para ello se emplearon distintas intensidades de potencia láser con el fin de inducir rotaciones más o menos rápidas. Se midió el espectro de emisión durante rotaciones de 90° y se calculó el valor del cociente de intensidades en función del tiempo. Un diagrama representativo de este tipo de medidas puede verse en la **Figura 5.28a**. A partir de cada uno de los diagramas del cociente de intensidades en función del tiempo, se midió el tiempo de rotación (Δt_R , ver **Figura 5.28a**). Éste está definido como el lapso de tiempo comprendido entre el último instante en el que I_{656}/I_{664} toma su valor mínimo (la partícula comienza a rotar) y el momento en el que alcanza su valor máximo (la partícula ha completado la rotación).

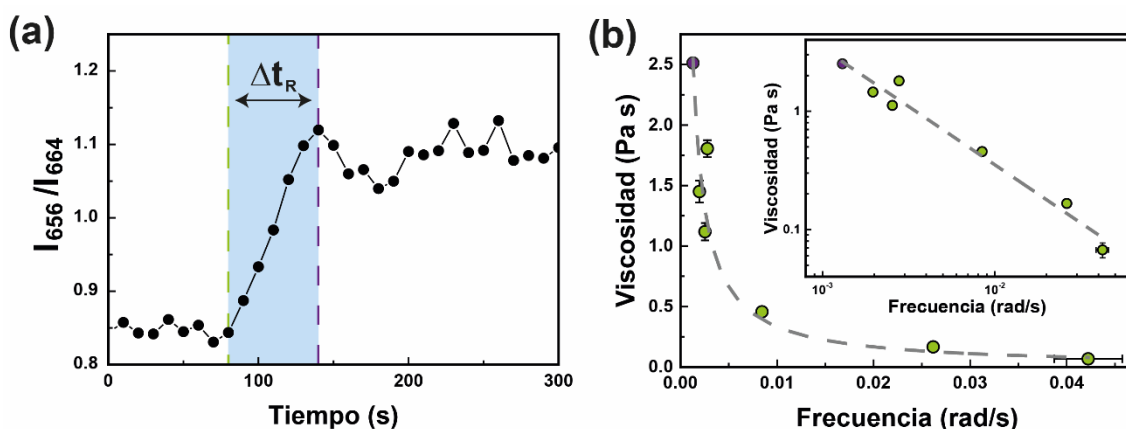


Figura 5.28 Método activo. (a) Evolución del cociente de intensidades en función del tiempo. Se indica el tiempo de rotación. (b) Valores de la viscosidad intracelular medida en función de la velocidad angular de rotación. Recuadro: Viscosidad intracelular en función de la velocidad angular de rotación en escala logarítmica.

Una vez medido Δt_R se calculó la velocidad angular de rotación ($\omega_R = 2/\pi\Delta t_R$) y, con ella, empleando la expresión 5.8, se obtuvo la viscosidad dinámica intracelular. En la **Figura 5.28b** se muestra la viscosidad dinámica medida en función de la velocidad angular de rotación. Se ha incluido también el valor medido mediante el método pasivo (dato morado), al que se le ha asignado un valor de velocidad angular de rotación igual a la raíz cuadrada del valor de MSAD alcanzado en el tiempo total de muestreo ($\omega_R = 1.18 \text{ rad} / 600 \text{ s} \cong 0.002 \text{ rad/s}$). Los resultados obtenidos muestran que, al aumentar la velocidad angular de rotación, la viscosidad decrece. De la representación en escala logarítmica (recuadro de la **Figura 5.28b**) se obtiene una pendiente de -1, que indica que la viscosidad dinámica medida es inversamente proporcional a la velocidad angular de rotación: $\eta_d \sim 1/\omega_R$.

Discusión.

Diferentes estudios muestran que el citoplasma es un fluido viscoelástico, por lo que su comportamiento reológico está a medio camino entre el de un fluido viscoso y un sólido elástico.[27, 39, 41] Un fluido viscoso es aquel que no puede resistirse al estrés mecánico o fuerza aplicada y únicamente puede ralentizar la deformación que se le impone. Una vez concluida la deformación, el fluido pierde memoria de su estado anterior (forma y localización). Un ejemplo claro de fluido viscoso es el agua. Por otro lado, un sólido elástico es aquel que se deforma al aplicarle una fuerza. Cuando el estímulo se termina, el material volverá a su forma original. Este es el comportamiento de las gomas elásticas.

A tiempos cortos (o velocidades angulares altas) el citoplasma se comporta como un medio principalmente elástico. En esta escala temporal, el citoplasma no tiene tiempo de reorganizar sus componentes y se opone a la deformación. Sin embargo, a tiempos largos (velocidades angulares bajas), el citoplasma es capaz de reorganizar los elementos de su citoesqueleto, por lo que puede fluir adecuándose a la deformación impuesta comportándose como un fluido viscoso. Los resultados obtenidos a través del método activo evidencian que el citoplasma se comporta como un medio viscoso en el intervalo de velocidades angulares estudiado, de acuerdo con estudios anteriormente publicados.[39] Los datos recogidos en la **Figura 5.28b** muestran que la viscosidad es inversamente proporcional a ω_R . Ésta es una propiedad característica de los medios viscosos.[27]

Se realizó un estudio de los valores de viscosidad intracelular publicados en la literatura para células HeLa con el fin de compararlos con los aquí obtenidos. Los resultados están recogidos en el anexo G. Existe una gran dispersión en los datos aportados por otros autores. Los resultados obtenidos en los estudios consultados pertenecen a un intervalo muy amplio, desde 0.06 a 3.78 Pa s. Algunos de ellos incluso llegan a no proporcionar un valor debido a la gran variabilidad que presentan los parámetros reológicos estudiados. El valor medio de los datos de viscosidades publicados (2 Pa s) por otros autores empleando métodos experimentales semejantes es similar al valor medio obtenido en esta tesis. Sin embargo, la comparación de datos obtenidos en diferentes estudios debe realizarse con cuidado, teniendo en cuenta diferentes factores:

1. Hay que hacer una distinción entre los resultados obtenidos empleando un método activo o pasivo. Como se ha comentado, cada uno de los métodos proporciona información acerca de viscosidades diferentes. La viscosidad estática es únicamente

proporcionada por el método pasivo, mientras que el método activo permite medir la viscosidad dinámica que, como se ha visto, depende del ritmo de deformación (velocidad angular de rotación). Además, dependiendo del intervalo de velocidades angulares estudiado, el citoplasma se comportará como un medio fundamentalmente viscoso o predominantemente elástico. Esto lleva también a variaciones en los parámetros medidos.

2. La viscosidad depende del tamaño de la partícula empleada para medirla.[27, 42] Kalwarczyk y colaboradores hicieron un análisis sobre la viscosidad medida empleando diferentes tamaños de partícula y concluyeron que la viscosidad efectiva se incrementa con el radio de la partícula y se vuelve constante para partículas mayores que la longitud característica de la “red efectiva” del citoplasma.[42] La “red efectiva” se refiere al conjunto de elementos que componen el citoplasma, como son los filamentos y microtúbulos del citoesqueleto y el resto de moléculas suspendidas en el interior celular (líneas negras en **Figura 5.29**). En este sentido, la interacción entre la partícula y el medio que la rodea dependerá de la relación de tamaño entre ella y los componentes del citoplasma. La viscosidad intersticial es aquella que afecta al transporte de moléculas pequeñas (< 50 nm) (esfera roja en **Figura 5.29**) y varía muy poco con el estado de la célula. En esta escala de tamaños, la viscosidad es del orden de la del agua. La viscosidad macroscópica tiene un valor del orden de 0.1 Pa s o mayor y es aquella que controla el movimiento de orgánulos como las mitocondrias o el núcleo (partícula verde en **Figura 5.29**). El valor de la viscosidad macroscópica depende de las condiciones celulares y puede verse afectado por agentes externos. Esta última es la viscosidad que se ha medido en este estudio, ya que las partículas empleadas son mayores que la escala de la red que forma el citoesqueleto de las células HeLa (> 350 nm).[42]

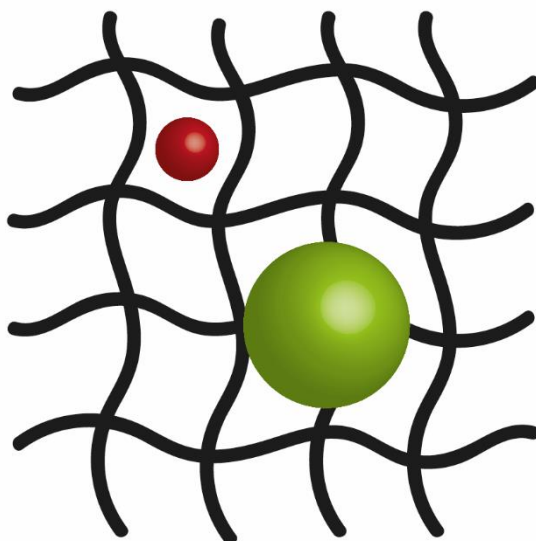


Figura 5.29 Viscosidad efectiva. Dependiendo de si el tamaño de la partícula es mayor o menor que la longitud característica de la red del citoesqueleto, su movimiento se verá afectado por la viscosidad intersticial (partícula roja) o por la viscosidad macroscópica (partícula verde).

3. También hay que tener en cuenta si la partícula se encuentra en contacto directo con los elementos del citoplasma o, por el contrario, se encuentra en el interior de una

vesícula debido al proceso de endocitosis por el que accedió al interior celular. Éste último es el caso de los experimentos realizados en esta tesis, como se comentó anteriormente.

4. El recubrimiento de la partícula también puede influir en su movimiento en el interior celular. Existen recubrimientos que facilitan la movilidad de las partículas por el citoplasma haciendo que la viscosidad efectiva sea menor que en ausencia del recubrimiento.[43]

Por último, es preciso comentar los distintos problemas experimentales encontrados. La localización de las partículas en el interior de las células no era un hecho inmediato. En algunas ocasiones eran necesarios varios minutos para encontrar una partícula susceptible de ser empleada ya que no todas podían ser usadas. El método activo requiere que la partícula se encuentre horizontal. Este hecho introduce una complicación extra ya que muchas de las partículas situadas en el interior de las células no se encontraban en esa orientación. Para la realización del método pasivo se requieren partículas en vertical. Este hecho no presentó un problema porque las partículas podrían ser primero rotadas y posteriormente utilizadas.

Conclusiones.

Se han presentado dos técnicas de medida basadas en el análisis de la emisión de partículas luminiscentes no esféricas. Cada una de ellas permite acceder a características distintas de la viscosidad intracelular. El método pasivo permite medir la viscosidad estática del citoplasma, mientras que método activo proporciona información de la viscosidad dinámica de la célula cuando ésta está siendo sujeta a una deformación. Se ha obtenido que el citoplasma de células HeLa se comporta como un medio viscoso en el intervalo de velocidades angulares estudiado, hecho anteriormente publicado por otros estudios.

La comparación de los resultados obtenidos empleando ambas técnicas con los valores de viscosidad medidos por otros autores empleando métodos similares evidencia la utilidad y capacidad de los dos aquí desarrollados.

5.6- Referencias.

1. T. Jung, et al., *The preferred upconversion pathway for the red emission of lanthanide-doped upconverting nanoparticles, NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(20): p. 13201.
2. F. M. Mor, et al., *Upconversion Particle as a Local Luminescent Brownian Probe: A Photonic Force Microscopy Study*. ACS Photonics, 2014. **1**(12): p. 1251.
3. Y. Cho, et al., *Spectral evidence for multi-pathway contribution to the upconversion pathway in NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ phosphors*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017. **19**(10): p. 7326.
4. S. Sarkar, et al., *Sub-5 nm Ln³⁺-doped BaLuF₅ Nanocrystals: A Platform to Realize Upconversion via Interparticle Energy Transfer (IPET)*. Advanced Materials, 2013. **25**(6): p. 856.
5. P. Chen, et al., *Polarization modulated upconversion luminescence: single particle vs. few-particle aggregates*. Nanoscale, 2015. **7**(15): p. 6462.
6. J. Zhou, et al., *Ultrasensitive Polarized Up-Conversion of Tm³⁺-Yb³⁺ Doped beta-NaYF₄ Single Nanorod*. Nano Letters, 2013. **13**(5): p. 2241.
7. J. T. Hu, et al., *Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods*. Science, 2001. **292**(5524): p. 2060.

8. P. Rodríguez-Sevilla, et al., *Determining the 3D orientation of optically trapped upconverting nanorods by in situ single-particle polarized spectroscopy*. *Nanoscale*, 2016. **8**(1): p. 300.
9. P. Rodríguez-Sevilla, et al., *Optical Torques on Upconverting Particles for Intracellular Microrheometry*. *Nano Letters*, 2016. **16**(12): p. 8005.
10. COMSOL, *Multiphysics*, 5.2, <http://www.comsol.com>.
11. P. Haro-Gonzalez, et al., *Optical trapping of NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺ upconverting fluorescent nanoparticles*. *Nanoscale*, 2013. **5**(24): p. 12192.
12. A. Andres-Arroyo, et al., *Optical Manipulation and Spectroscopy Of Silicon Nanoparticles Exhibiting Dielectric Resonances*. *Nano Letters*, 2016. **16**(3): p. 1903.
13. F. Hajizadeh and S. N. S.Reihani, *Optimized optical trapping of gold nanoparticles*. *Optics Express*, 2010. **18**(2): p. 551.
14. P. M. Hansen, et al., *Expanding the Optical Trapping Range of Gold Nanoparticles*. *Nano Letters*, 2005. **5**(10): p. 1937.
15. W. H. Wright, et al., *Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers*. *Applied Optics*, 1994. **33**(9): p. 1735.
16. N. Khatibzadeh, et al. *Effects of media viscosity and particle size on optical trapping of microspheres*. in *Conference on Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII*. 2014. San Francisco, CA: SPIE.
17. A. V. Kachynski, et al., *Measurement of optical trapping forces by use of the two-photon-excited fluorescence of microspheres*. *Optics Letters*, 2003. **28**(23): p. 2288.
18. B. Paul and H. Stuart, *Three-dimensional force calibration of a single-beam optical gradient trap*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2002. **14**(33): p. 7757.
19. A. Rohrbach, *Stiffness of Optical Traps: Quantitative Agreement between Experiment and Electromagnetic Theory*. *Physical Review Letters*, 2005. **95**(16): p. 168102.
20. L. Jauffred and L. B. Oddershede, *Two-Photon Quantum Dot Excitation during Optical Trapping*. *Nano Letters*, 2010. **10**(5): p. 1927.
21. C. D. S. Brites, et al., *Thermometry at the nanoscale*. *Nanoscale*, 2012. **4**(16): p. 4799.
22. H. B. Mao, et al., *Temperature control methods in a laser tweezers system*. *Biophysical Journal*, 2005. **89**(2): p. 1308.
23. E. A. Coronado, et al., *Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale*. *Nanoscale*, 2011. **3**(10): p. 4042.
24. P. Haro-González, et al., *Quantum Dot-Based Thermal Spectroscopy and Imaging of Optically Trapped Microspheres and Single Cells*. *Small*, 2013. **9**(12): p. 2162.
25. G. Baffou, et al., *Thermoplasmonics modeling: A Green's function approach*. *Physical Review B*, 2010. **82**(16): p. 165424.
26. Z. Qin and J. C. Bischof, *Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(3): p. 1191.
27. D. Wirtz, *Particle-Tracking Microrheology of Living Cells: Principles and Applications*, in *Annual Review of Biophysics*. 2009. p. 301.
28. T. Liu, et al., *Quantitatively Mapping Cellular Viscosity with Detailed Organelle Information via a Designed PET Fluorescent Probe*. *Scientific Reports*, 2014. **4**: p. 5418.
29. S. Suresh, et al., *Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria*. *Acta Biomaterialia*, 2005. **1**(1): p. 15.
30. E. O. Puchkov, *Intracellular viscosity: Methods of measurement and role in metabolism*. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2013. **7**(4): p. 270.
31. Y. A. Ayala, et al., *Rheological properties of cells measured by optical tweezers*. *Bmc Biophysics*, 2016. **9**.
32. Y.-Q. Chen, et al., *Intracellular viscoelasticity of HeLa cells during cell division studied by video particle-tracking microrheology*. *Journal of Biomedical Optics*, 2013. **19**(1): p. 011008.
33. L. Chevry, et al., *Intracellular micro-rheology probed by micron-sized wires*. *Biomaterials*, 2013. **34**(27): p. 6299.
34. J. S. H. Lee, et al., *Ballistic intracellular nanorheology reveals ROCK-hard cytoplasmic stiffening response to fluid flow*. *Journal of Cell Science*, 2006. **119**(9): p. 1760.

35. C. Ying-chun and W. Chien-ming, *To Study the Effect of Paclitaxel on the Cytoplasmic Viscosity of Murine Macrophage Immune Cell RAW 264.7 Using Self-Developed Optical Tweezers System*. Japanese Journal of Applied Physics, 2012. **51**(12R): p. 127001.
36. M. K. Kuimova, et al., *Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(21): p. 6672.
37. M. K. Kuimova, et al., *Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death*. Nat Chem, 2009. **1**(1): p. 69.
38. K. Fushimi and A. S. Verkman, *Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry*. Journal of Cell Biology, 1991. **112**(4): p. 719.
39. J. F. Berret, *Local viscoelasticity of living cells measured by rotational magnetic spectroscopy*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 10134.
40. S. Chen, et al., *Mapping Live Cell Viscosity with an Aggregation-Induced Emission Fluorogen by Means of Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging*. Chemistry – A European Journal, 2015. **21**(11): p. 4315.
41. A. Ashkin and J. M. Dziedzic, *Internal cell manipulation using infrared laser traps*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(20): p. 7914.
42. T. Kalwarczyk, et al., *Comparative Analysis of Viscosity of Complex Liquids and Cytoplasm of Mammalian Cells at the Nanoscale*. Nano Letters, 2011. **11**(5): p. 2157.
43. Y. Y. Hui, et al., *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy of lipid-encapsulated fluorescent nanodiamonds in living cells*. Optics Express, 2010. **18**(6): p. 5896.

CAPÍTULO 6: Conclusiones.

En este capítulo se recogen de manera detallada las conclusiones más importantes obtenidas en los diferentes estudios presentados en el capítulo 5, así como las perspectivas futuras derivadas de esta tesis.

6.1- Estudios de partículas individuales.

6.1a- Proceso de *upconversion* en una micropartícula de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$.

Los estudios realizados muestran que los procesos físicos que dan lugar al fenómeno de *upconversion* en partículas micrométricas aisladas no difieren de los descritos con anterioridad para sistemas macroscópicos.

6.1b- Espectro de una nanopartícula ópticamente aislada.

El atrapamiento óptico ha permitido aislar una única nanopartícula en dispersión y estudiar sus propiedades luminiscentes. Experimentalmente se ha demostrado que el espectro de emisión de una nanopartícula ópticamente aislada es distinto al obtenido para disoluciones coloidales. En particular, se observó cómo el número de nanopartículas que contribuyen al espectro de emisión afectaba de manera relevante a su forma espectral dando lugar a cambios en la intensidad relativa de las diferentes líneas de emisión.

Las diferencias espectrales entre la emisión de una única nanopartícula ópticamente aislada y la emisión de un conjunto de ellas se han atribuido a la existencia de una interacción entre las nanopartículas en dispersión. En esta tesis se propone que el mecanismo responsable de la modulación del espectro es la transferencia de energía entre nanopartículas mediada por colisiones.

6.1c- Emisión polarizada.

Los resultados obtenidos en los estudios de espectroscopía polarizada de partículas con forma de disco o cilíndricas formadas por una matriz de NaYF_4 dopadas con Er^{3+} e Yb^{3+} está polarizada. Este hecho se asocia a la existencia de un eje óptico perpendicular a la sección hexagonal de las partículas. Además, se comprobó experimentalmente que el comportamiento de la emisión polarizada no depende del tamaño de la partícula, aunque la relación de aspecto puede hacer que el grado de polarización del sistema sea mayor o menor. Por último, se comprobó que la emisión de disoluciones coloidales está despolarizada debido a la orientación aleatoria de las partículas.

6.1d- Conclusiones generales de los estudios de partículas individuales.

Los estudios espectroscópicos incluidos en esta tesis doctoral, realizados sobre partículas individuales, ponen de manifiesto que las conclusiones obtenidas del análisis de la emisión de dispersiones coloidales no pueden aplicarse a partículas aisladas, ya que las propiedades luminiscentes de las partículas individuales difieren de las que presenta un conjunto de ellas.

En primer lugar, la presencia de una interacción entre las partículas hace que el espectro total de un conjunto de ellas esté modulado. Además, las partículas no esféricas presentan una emisión polarizada que hace que el espectro de emisión de una única partícula dependa de su orientación. Esta propiedad se pierde cuando se estudia un conjunto de partículas en dispersión debido a su orientación aleatoria en el fluido.

Los estudios realizados han sido posibles gracias al atrapamiento óptico. Esta herramienta ha permitido aislar una única nanopartícula con el fin de eliminar su interacción con el resto de nanopartículas y poder analizar el espectro “puro” de una sola de ellas.

Por último, estos estudios ponen de manifiesto la necesidad de caracterizar la luminiscencia de partículas individuales para su posterior uso. Un mal conocimiento de las propiedades luminiscentes de la partícula puede llevar a la malinterpretación de los resultados obtenidos en experimentos de manipulación óptica de partículas.

6.2- Orientación de partículas ópticamente atrapadas.

Los resultados obtenidos de la caracterización de la emisión polarizada de partículas individuales permitieron determinar la orientación de partículas ópticamente atrapadas. Se comprobó experimentalmente que aquellas que presentan una geometría cilíndrica son atrapadas con su eje longitudinal paralelo a la dirección de propagación del haz de atrapamiento. Un resultado similar fue obtenido para partículas en forma de disco. Éstas también se orientan con su eje longitudinal paralelo al haz de atrapamiento. Además, al alcanzar la orientación vertical, rotan de tal manera que su eje óptico queda paralelo a la polarización del láser.

Para el caso de partículas en forma de disco, estos resultados fueron analizados teóricamente a través del cálculo la magnitud y dependencia con el ángulo de rotación de los torques ópticos que actúan sobre la partícula determinando su orientación. De este análisis se concluyó que la orientación de las partículas en la trampa está principalmente determinada por su geometría espacial. En una primera aproximación, se puede considerar que, debido a su tamaño, las partículas estudiadas se comportan como un dipolo eléctrico y magnético para la longitud de onda de atrapamiento empleada. Analizando las diferentes componentes de los torques ópticos implicados se concluyó que la orientación final de la partícula en la trampa es principalmente debida a la interacción entre la radiación de atrapamiento y el dipolo magnético de la partícula.

Por último, se estudió la manipulación de partículas cilíndricas empleando dos trampas ópticas. La emisión polarizada demostró que las partículas pueden ser manipuladas en el plano perpendicular a la dirección de propagación de los haces de atrapamiento.

6.3- Influencia de las características de la nanopartícula en la fuerza óptica.

Se midieron las fuerzas ópticas ejercidas sobre nanopartículas dieléctricas de tamaños comprendidos entre 8 y 200 nm. De los resultados obtenidos se determinó que, contrariamente a lo que se asume en la literatura, la relación entre las constantes de atrapamiento medidas y el volumen de las partículas no sigue una tendencia lineal.

Por otro lado, se demostró la fuerte dependencia de las fuerzas ópticas con el valor del potencial zeta de las nanopartículas. Para valores de potencial zeta menores o cercanos a 30 mV, la fuerza de atrapamiento es reducida y prácticamente independiente del valor del potencial zeta. Sin embargo, para valores superiores a esa cifra, la fuerza de atrapamiento aumenta abruptamente. Estos resultados hacen concluir que las propiedades electrostáticas de la nube de carga que rodea a la partícula juegan un papel determinante en las fuerzas ópticas que actúan sobre este tipo de nanopartículas.

6.4- Medidas de temperatura a nivel celular.

El atrapamiento óptico de una partícula de *upconversion* y la medida simultánea de su espectro de emisión permitieron observar que en los alrededores de una célula sometida a un tratamiento fototérmico se genera un gradiente térmico que se extiende decenas de micras respecto a su membrana. Este resultado evidencia que el calor generado en el interior de la célula no queda confinado por los límites de ésta.

6.5- Medida de la viscosidad intracelular.

Se han desarrollado dos nuevas técnicas microreométricas, denominadas método activo y pasivo, que han permitido caracterizar la viscosidad intracelular de células HeLa. El método activo ha posibilitado estudiar cómo varía la viscosidad dinámica de la célula cuando ésta es sometida a una deformación. Con esta técnica se ha podido determinar el carácter viscoso del citoplasma en el intervalo de frecuencias estudiado. Por otro lado, el método pasivo ha permitido caracterizar la viscosidad estática de la célula. Los resultados obtenidos con ambos métodos están de acuerdo con los publicados por otros autores empleando técnicas similares.

6.6- Perspectivas futuras.

Durante esta tesis se ha desarrollado y modificado un sistema de pinzas ópticas que ha permitido estudiar partículas de tamaños tanto nano como micrométricos. El sistema experimental está diseñado de tal manera que puede modificarse para así ampliar sus capacidades. Por ejemplo, podría adaptarse para permitir la realización estudios de luminiscencia con el tiempo con el fin de medir las vidas medias de partículas ópticamente aisladas. Esto permitiría analizar en mayor detalle la interacción que existe entre partículas coloidales y, por ejemplo, determinar si ésta es de carácter radiativo o no.

Respecto a las medidas microreométricas desarrolladas en esta tesis, ya se ha comenzado a realizar un estudio celular más complejo en el que se determina el efecto que tienen ciertos fármacos en la viscosidad intracelular. Este tipo de estudios son de gran importancia ya que, por ejemplo, las propiedades reológicas de la célula permiten la detección de enfermedades.

Las técnicas desarrolladas presentan algunos problemas experimentales que podrían solventarse. La manera de introducir las partículas en el interior de las células (endocitosis) hace que las partículas presenten una vesícula a su alrededor que puede influir en las medidas. Este proceso también hace que las partículas no estén presentes en todas las células por igual. Una mejora que se plantea es la introducción de las partículas

empleando otras técnicas, como la photoporation y la denominada como *Laser-induced breackdown* (LIB). Ambos métodos consisten en generar un poro temporal en la membrana celular por el que se introducen las partículas. De esta manera, se pueden introducir las partículas en el interior de las células de manera controlada y colocarlas en la región celular deseada si se combinan con el atrapamiento óptico. Además, se evitaría que la partícula quede encerrada en el interior de la vesícula endocítica.

En un futuro me gustaría continuar con esta línea de investigación y desarrollar herramientas basadas en el atrapamiento óptico destinadas al diagnóstico. Por ejemplo, ya existe una técnica denominada *Laser tweezers Raman spectroscopy* basada en el atrapamiento óptico de células y la medida de su espectro Raman. Con ella se pueden caracterizar células aisladas y determinar su carácter cancerígeno. Técnicas semejantes se podrían desarrollar combinando el atrapamiento óptico con la microscopía óptica, empleando también nano y micropartículas. El montaje experimental desarrollado en esta tesis constituye la herramienta perfecta para este fin.

Los materiales de *upconversion* estudiados en esta tesis presentan gran potencial, pero también algunas desventajas. Como ya se ha comentado, las fuerzas ópticas ejercidas sobre partículas de este tipo de materiales dieléctricos son reducidas. Sin embargo, no liberan calor debido a la acción del haz de atrapamiento, lo que las convierte en mejores candidatas para el atrapamiento óptico en entornos biológicos que, por ejemplo, las partículas metálicas, que presentan mayores fuerzas de atrapamiento, pero sí generar ese incremento de su temperatura. El estudio fundamental de las características de las partículas dieléctricas y su relación con las fuerzas de atrapamiento puede potenciar el diseño de éstas para aplicaciones concretas. Por ejemplo, el aumento de la fuerza de atrapamiento sobre nanopartículas permitiría su manipulación en medios altamente viscosos como es el interior celular. Además, este diseño previo de las partículas es necesario para solventar los problemas experimentales encontrados a la hora de realizar las medidas térmicas a nivel celular. Pueden modificarse las características electrostáticas de la partícula para evitar su adhesión a la membrana celular y el soporte donde se encuentran las células.

Respecto a las propiedades luminiscentes de las partículas de *upconversion* estudiadas en esta tesis hay que destacar que su emisión en el visible las limita a estudios *in vivo* e *in vitro* en los que el sistema analizado sea transparente a esas longitudes de onda, como es el caso de los embriones de pez zebra (*zebra fish*) y las células. Además, la longitud de onda de 980 nm, necesaria para excitar de manera eficiente su luminiscencia, puede ser dañina para el espécimen a estudio si no se controlan la intensidad de potencia y el tiempo de exposición empleados. En un futuro, se podría desarrollar partículas de *upconversion* cuya excitación y luminiscencia se encuentran en los intervalos de longitudes de onda asociados a las denominadas ventanas biológicas, en las que los tejidos presentan un mínimo en la absorción y *scattering* de la luz. Ya existen partículas (no de *upconversion*) con estas características que ya se están empleando en multitud de estudios diferentes. Por esta razón, el futuro de las partículas de *upconversion* se encuentra en la posibilidad de generar radiación de alta energía tras la absorción de luz de baja energía de longitud de onda en las ventanas biológicas. De esta manera se pueden irradiar con luz ultravioleta o visible lugares en el interior de tejidos a los que esas longitudes de onda no pueden llegar por sí solas. Las partículas de *upconversion* pueden ser localizadas en esas regiones

y su luminiscencia activada con radiación con longitud de onda en una de las ventanas biológicas cuya penetración en los tejidos es mayor. Esta es la base de algunas técnicas como la terapia fotodinámica.

CAPÍTULO 7: Conclusions.

The main conclusions obtained from the different studies presented in chapter 5 are here described in detail. In addition, the future perspectives derived from this thesis are included.

7.1- Single particle studies.

7.1a- Upconversion process in a $\text{NaYF}_4\text{:Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$ microparticle.

The studies carried out show that the physical processes that lead to the upconversion phenomenon in a single microparticle are in good agreement with those published for microscopic systems.

7.1b- Spectroscopy of an optically isolated nanoparticle.

Optical trapping has allowed the isolation of a single nanoparticle in solution for the characterization of its luminescent properties. It has been experimentally demonstrated that the emission spectrum of an optically isolated nanoparticle is different from that obtained for a colloidal dispersion. In particular, it has been observed that the number of nanoparticles contributing to the emission spectra deeply affects its spectral shape, leading to drastic changes in the relative intensity between different emission lines.

The spectral differences between the emission of a single, optically isolated nanoparticle and that of a group of them has been attributed to the interaction between nanoparticles in solution. In this doctoral thesis, interparticle collision assisted energy transfer has been proposed to be the main mechanism responsible for the spectral modulation.

7.1c- Polarized emission.

Polarized spectroscopy studies showed that the emission of Er^{3+} and Yb^{3+} codoped NaYF_4 disc-like or cylindrical particles is polarized. This fact is associated to the existence of an optical axis perpendicular to the hexagonal facet of the particle. In addition, it has been experimentally corroborated that the particle size does not affect the polarized emission behavior, however the aspect ratio influences the polarization degree. Finally, it has been shown that the emission obtained from a colloidal dispersion of particles is unpolarized due to the random orientation of the particles in the fluid.

7.1d- General conclusions for single particle studies.

The spectroscopic studies included in this thesis show that the conclusions obtained for the analysis of the emission of colloidal dispersions of particles cannot be applied to isolated particles since the luminescent properties of single particle differ from those presented by a group of them.

In particular, the emission of a group of particles is modulated by the interaction between them. In addition, the emission spectrum of non-spherical particles depends on the orientation of the particle, given that it is polarized. This property is lost when a colloidal solution is studied due to the random distribution of the particles inside the solution.

Optical trapping has made these studies possible. This tool has allowed to isolate a single particle in order to prevent its interaction with other particles making possible the analysis of its pure spectrum.

Finally, this studies evidence the necessity of characterizing the luminescence of individual particles for their subsequent use. Inadequate knowledge of the luminescent properties of the particle could lead to the misunderstanding of the results.

7.2- Orientation of particles inside the optical trap.

The stable orientation of the trapped particle inside the optical trap has been determined using the characterization of its polarized luminescence. It has been found that cylindrical particles orient with their longitudinal axis parallel to the propagation direction of the trapping beam. A similar result was obtained for disc-like particles. They also orient with their longitudinal axis parallel to the trapping beam propagation direction. In addition, once the vertical configuration is reached, they spin till its optical axis is parallel to the polarization direction of the trapping beam.

The orientation of disc-like particles has been also theoretically analyzed through the numerical calculation of the magnitude and dependence with the rotation angle of the optical torques that act over the trapped particle. This numerical calculation evidenced that the spatial geometry of the particle determines its stable orientation. In a first order approximation, the particles can be considered as an electric and a magnetic dipole. Through the analysis of the different components of the torques, it has been found that the stable orientation of the particle within the optical trap is mainly due to the interaction between the trapping radiation and the magnetic dipole of the particle.

Finally, the optical manipulation of cylindrical particles by using two optical traps has been studied. Polarized emission demonstrated that the particles can be manipulated in a plane which is perpendicular to the propagation direction of the two trapping beams that create the optical traps.

7.3- Influence of the particle characteristics on the optical forces.

The optical forces acting on dielectric nanoparticles with sizes ranging between 8 and 200 nm have been measured. On the one hand, results evidenced that, contrary to what is widely assumed in the literature, there is no linear dependence of the trapping constant with the particle's volume.

On the other hand, the strong dependence of the optical forces with the zeta potential of the nanoparticles has been demonstrated. For zeta potential values lower or around 30 mV, the optical trapping force is weak and almost independent of the zeta potential value. However, for zeta potential values higher than that figure, the optical force strongly increases. The results evidence that the electrostatic characteristics of the particle play an important role in the determination of the optical forces acting over this type of nanoparticles.

7.4- Thermometry at cellular level.

Simultaneous optical trapping of a single upconverting particle and measurement of its luminescence have been used to characterize the thermal gradient that appears in the surroundings of a photothermically treated cell. This thermal gradient extends tens of microns from the cell membrane. This results evidences that the heat generated inside the cell it is not confined within the cellular membrane.

7.5- Intracellular viscosity measurements.

Two new microrheometric techniques, named active and passive methods, have been developed. Both of them have allowed to characterize the intracellular viscosity of HeLa cells. The active method measures the dynamic viscosity when the cell is subjected to a deformation. With this technique, the viscous character of the cytoplasm has been demonstrated in the used frequency regime. On the other hand, the passive method has allowed to measure the static viscosity of the cytoplasm. The results obtained with both methods are in good agreement with those published by other authors when using similar techniques.

7.6- Future perspectives.

During this doctoral thesis, an optical tweezers setup has been developed and modified for the study of both nano and microparticles. The experimental setup is designed in such a way that it could be updated for the widening of its capabilities. For example, it could be adapted for its use in lifetime measurements on optically isolated particles. This can allow to analyze in more detail the interaction between nanoparticles and, for example, determine whether it is a radiative or a non-radiative process.

In respect to the microrheometric techniques, more complex *in vitro* studies for the determination of the effect of certain drugs on the intracellular viscosity have been started. Such studies are of great importance since, for example, the characterization of the rheological properties of the cell could be used for the detection of diseases.

The developed techniques present some experimental drawbacks that could be resolved. Due to the way the particles are introduced inside the cells (endocytosis), they are immersed in a vesicle that could interfere in the measurements. Moreover, as a results of this process, the number of particles interiorized by different cells is not the same. One of the improvements is based on the use of other methods to introduce the particles inside the cells, such as the photoporation or the Laser-induced breakdown techniques. Both of them consist on the generation of a temporal pore in the cellular membrane through which the particles can be introduced. Thus, they can be put inside the cells in a controlled way and located in the desired cellular region, if this techniques are combined with optical trapping. In addition, the production of the endocytic vesicle where the particle is englobed can be prevented.

In the future, I would like to continue with this research line and develop new optical-trapping-based tools for diagnosis, such as the Laser tweezers Raman spectroscopy technique, which allows to trap and measure the Raman spectrum of isolated cells for the determination of its carcinogenic character. Similar methods can be developed by

combining optical trapping and spectroscopy of particles. The experimental setup developed in this thesis constitutes the perfect tool for such purpose.

The upconverting materials studied in this thesis present a great potential but also some drawbacks. As it has been already pointed out, optical forces exerted over particles made of such dielectric materials are weak. However, these particles do not generate laser-mediated heat, thus they are better candidates for optical trapping in biological environments than, for example, metallic particles, which present higher optical forces but they do produce heating after laser absorption. A deep fundamental study of the characteristics of dielectric particles and their relationship with optical forces could boost the design of such particles for specific applications. For example, the enhancement of optical forces exerted over nanoparticles could allow their optical manipulation in high viscous media, such as the intracellular environment. Moreover, this preliminary design is mandatory to solve the experimental problems encountered during thermal reading experiments. Electrostatic characteristics of the particles can be modified to prevent their adhesion to the cell membrane and substrate.

With respect to the luminescent properties of the upconverting particles studied along this thesis, it should be pointed out that their emission limit them to their use in *in vivo* and *in vitro* studies where the specimen under study is transparent (does not absorb or scatter) at those wavelengths as it is the case of zebra fish larvae and cells. In addition, 980 nm radiation, needed for a proper excitation of their luminescence, could damage the specimen under study if laser intensity or exposure time are not controlled. Upconverting particles with excitation and luminescence at wavelengths in the biological windows, where tissues present a minimum in the absorption and scattering, can be designed. Such type of particles (not upconverting ones) already exist and they are widely used in different biological studies. For this reason, the future of upconverting particles is in their capability of producing high energy radiation after the absorption of lower energy photons with wavelength in the biological windows. Thus, areas inside tissues can be irradiated by visible or ultraviolet light which, in normal conditions, cannot penetrate that deep. Upconverting particles can be located in those regions and their luminescence activated with deep tissue penetration radiation. This is the base of some therapies, such as photodynamic technique.

ANEXOS.

Anexo A. Cálculo de incertidumbres en medidas térmicas.

A continuación se detallan los cálculos realizados para la obtención de las incertidumbres de las magnitudes que intervienen en la medida de la temperatura por el cambio espectral de la banda de emisión.

Anexo A.1. Resolución en la temperatura.

La expresión que relaciona la temperatura con el cociente de intensidades y la sensibilidad es:

$$T - T_0 = \frac{C - C_0}{C} \frac{1}{S_r} \quad (\text{A.1})$$

Por propagación de errores, la incertidumbre en la temperatura es:

$$\Delta T = \left| \frac{\partial T}{\partial C} \right| \Delta C + \left| \frac{\partial T}{\partial S_r} \right| \Delta S_r \quad (\text{A.2})$$

$$\Delta T = \left| \frac{1}{S_r} \left(\frac{1}{C} - \frac{C - C_0}{C^2} \right) \right| \Delta C + \left| \frac{C - C_0}{C S_r^2} \right| \Delta S_r \quad (\text{A.3})$$

Anexo A.2. Resolución en la sensibilidad:

La sensibilidad viene dada por:

$$S_r = \frac{1}{C} \frac{dC}{dT} \quad (\text{A.4})$$

Por propagación de errores, su incertidumbre es:

$$\Delta S_r = \left| \frac{\partial S_r}{\partial C} \right| \Delta C + \left| \frac{\partial S_r}{\partial \left(\frac{dC}{dT} \right)} \right| \Delta \left(\frac{dC}{dT} \right) \quad (\text{A.5})$$

$$\Delta S_r = \left| \frac{1}{C^2} \frac{dC}{dT} \right| \Delta C + \frac{1}{C} \Delta \left(\frac{dC}{dT} \right) \quad (\text{A.6})$$

La incertidumbre en la derivada del cociente es:

$$\Delta \left(\frac{dC}{dT} \right) = \left| \frac{\partial \left(\frac{dC}{dT} \right)}{\partial C} \right| \Delta C + \left| \frac{\partial \left(\frac{dC}{dT} \right)}{\partial T} \right| \Delta T \quad (\text{A.7})$$

Por un lado, se supone que el error en la temperatura de calibración es despreciable. Por otro lado, se tiene, de la expresión 3.17, que:

$$\frac{dC}{dT} = \frac{d}{dT} \left(cte \cdot e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \right) = -cte \frac{\Delta E}{k_B T} e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (\text{A.8})$$

Sustituyendo por las expresiones 3.17 y 3.19:

$$\frac{dC}{dT} = -S_r C \quad (\text{A.9})$$

La derivada respecto del cociente es:

$$\left| \frac{\partial \left(\frac{dC}{dT} \right)}{\partial C} \right| = -S_r \quad (\text{A.10})$$

Sustituyendo la expresión A.10 en A.7:

$$\Delta \left(\frac{dC}{dT} \right) = S_r \Delta C \quad (\text{A.11})$$

Sustituyendo la expresión A.11 en A.6 el error en la sensibilidad queda:

$$\Delta S_r = \frac{2S_r}{C} \Delta C \quad (\text{A.12})$$

Anexo B. Transferencia de energía entre nanopartículas.

Anexo B.1. Cálculo del solape espectral.

El solape espectral entre la banda de emisión y absorción puede calcularse a través de la siguiente expresión:

$$S = \int g_A(\nu) g_E(\nu) d\nu \quad (\text{B.1})$$

Donde $g_A(\nu)$ y $g_E(\nu)$ son las funciones de línea del espectro de absorción y emisión en el espacio de frecuencias, respectivamente. Estas funciones de línea pueden obtenerse de los espectros de absorción ($DO(\nu)$) y emisión ($I(\nu)$). Para ello hay que calcular la integral por unidad de área de los espectros:

$$g_A(\nu) = \frac{DO(\nu)}{\int DO(\nu) d\nu} \quad (\text{B.2})$$

$$g_E(\nu) = \frac{I(\nu)}{\int I(\nu) d\nu} \quad (\text{B.3})$$

Una vez obtenidas las funciones de línea, se calcula la integral de su producto para obtener el solape.

Anexo B.2. Probabilidad de transferencia radiativa entre dos nanopartículas.

La probabilidad de transferencia radiativa entre dos nanopartículas de diámetro $2R$ separada por una distancia d es:

$$W_{rad} = \frac{A \sigma_A}{4\pi(d-2R)^2} \int g_A(\nu) g_E(\nu) d\nu \quad (\text{B.4})$$

Donde A es la probabilidad de emisión espontánea y σ_A la sección eficaz de absorción de la partícula.

La probabilidad de emisión espontánea puede obtenerse de la expresión 3.14, donde el módulo del elemento de matriz del momento dipolar eléctrico puede aproximarse por $|\mu_{if}| \cong eR$, donde e es la carga elemental y R el radio de la partícula.

Por último, la sección eficaz de absorción de una única partícula puede obtenerse del espectro de absorción medido para la dispersión de partículas:

$$\sigma_A(\lambda) = \frac{DO(\lambda)}{\left[\frac{NPs}{cm^3}\right] l \log(e)} \quad (\text{B.5})$$

Donde l y $\left[\frac{NPs}{cm^3}\right]$ representan el espesor y la concentración de partículas de la muestra, respectivamente. La concentración de la muestra en número de nanopartículas por cm^3 se puede obtener de la densidad del material (ρ) que forma las partículas y el volumen (V) que ocupan éstas:

$$\left[\frac{NPs}{cm^3} \right] = \left[\frac{mg}{ml} \right] \chi \frac{1 \text{ partícula}}{\rho V} \quad (\text{B.6})$$

Anexo B.3. Cálculo de la distancia crítica.

La distancia crítica se define como la distancia a la que la probabilidad de transferencia de energía se iguala la probabilidad de emisión espontánea. Sustituyendo $W_{rad} = A$ en la expresión B.4 se obtiene:

$$d_{crit} = 2R + \sqrt{\frac{\sigma_A}{4\pi} \int g_A(\nu) g_E(\nu) d\nu} \quad (\text{B.7})$$

Para obtener d_{crit} deben calcularse el solape entre la emisión de la partícula donante y la absorción de la partícula aceptora, al igual que la sección eficaz de absorción de esta última.

Anexo C. Emisión verde de una partícula cilíndrica.

Se realizó un estudio de luminiscencia polarizada de la banda de emisión verde de partículas cilíndricas depositadas.

En la **Figura A.1** se muestran dos espectros de emisión normalizados obtenidos para dos estados de polarización perpendiculares. Se puede ver que la emisión cambia con el estado de polarización, pero la modulación espectral no es significativa. Los mayores cambios se dan en la banda de emisión asociada a la transición $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, centrada en torno a 550 nm. Existen variaciones en las emisiones de ciertos niveles Stark, incluso la emisión en torno a 556 nm se desplaza en longitud de onda.

Este cambio de la emisión con la polarización no es tan significativo como el que se aprecia en la banda de emisión roja. Por esta razón, los estudios de espectroscopía polarizada de partículas aisladas se centraron en esta última y no en la banda del verde.

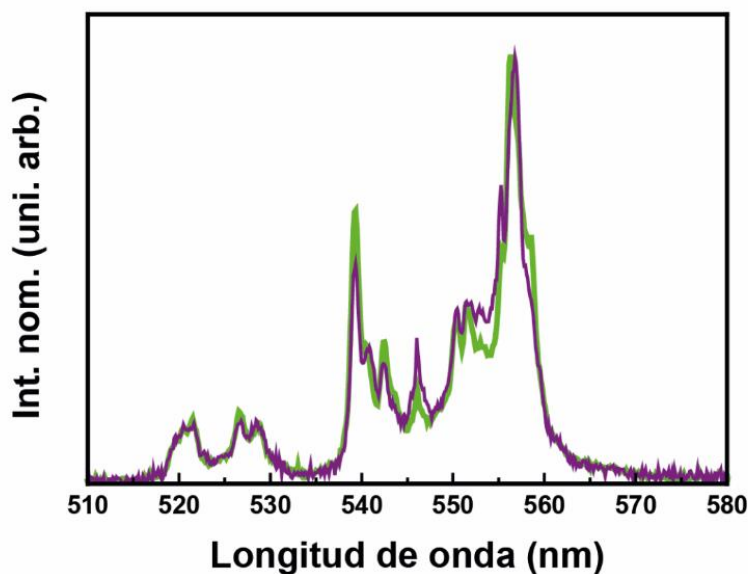


Figura A.1 Espectroscopía polarizada para la emisión verde. Se muestran dos espectros de emisión medidos para dos estados de polarización perpendiculares: a lo largo del eje longitudinal de la partícula cilíndrica (morado) y perpendicularmente a él (verde).

Anexo D. Interiorización de partículas cilíndricas de oro por células HeLa.

Las células fueron cultivadas con las nanopartículas de oro (GNRs) y luego fijadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.4b. Posteriormente, se realizaron imágenes ópticas y de luminiscencia multifotónica (ver sección 4.3e) para determinar la presencia de las partículas de oro en el interior de las células.

En la **Figura A.2a** se muestran los resultados obtenidos en células incubadas con (izquierda) y sin (derecha) GNRs. La longitud de onda de excitación fue 830 nm, muy próxima a la de la SPR de las partículas (ver **Figura A.2b**). Se puede ver como únicamente las células incubadas con GNRs presentan luminiscencia. Este resultado evidencia la incorporación de las partículas por las células.

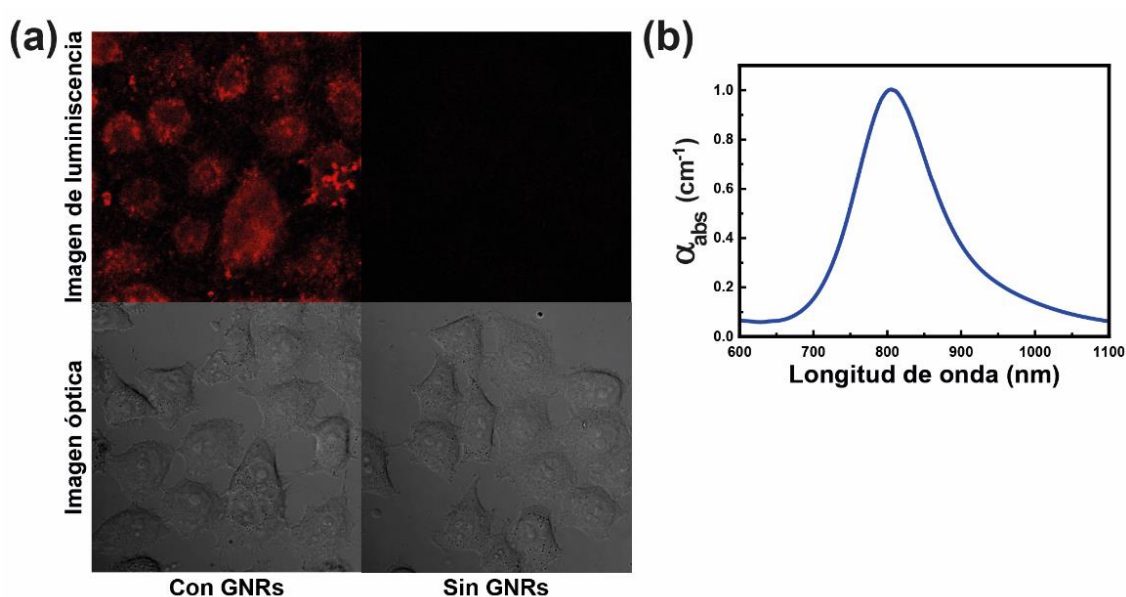


Figura A.2 Incorporación de GNRs por células HeLa. (a) Imágenes de luminiscencia (arriba) y sus correspondientes imágenes ópticas (abajo) de células incubadas con (izquierda) y sin (derecha) GNRs. (b) Espectro de absorción de la dispersión de GNRs.

Anexo E. Microreometría.

Anexo E.1. Método activo.

A continuación se presenta el desarrollo teórico empleado para la obtención de la relación entre la viscosidad dinámica y la velocidad angular de rotación (expresión 5.8).

Cuando la partícula rota por acción del torque óptico (τ_{OT}), aparece un torque debido a la fuerza de rozamiento (τ_D) que intenta frenarla. Además, hay que tener en cuenta que el disco posee una masa (M), por lo que la gravedad actúa también frenando el movimiento (τ_G). Por último, la partícula está sometida a las fluctuaciones térmicas que también producen un torque (τ_{Th}). En la **Figura A.3** se han representado los torques que actúan sobre la partícula. Teniendo esto en cuenta, la ecuación de Langevin que describe la rotación de las partículas puede escribirse como:

$$I\ddot{\theta} = \tau_{Th} + \tau_D + \tau_{OT} + \tau_G \quad (\text{E.1})$$

$$I\ddot{\theta} = \tau_{Th} - \beta\dot{\theta} + \tau_{OT} + \tau_G \quad (\text{E.2})$$

Donde θ representa el ángulo de giro, I es la inercia rotacional de la partícula y β su coeficiente de rozamiento.

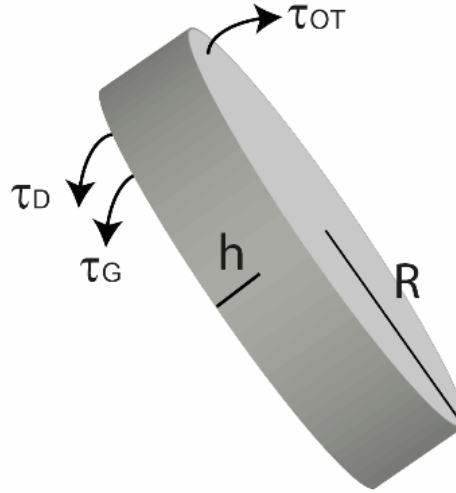


Figura A.3 Representación esquemática de los torques que actúan sobre la partícula.

Las partículas pueden aproximarse por discos de sección circular de 800 nm de diámetro y 400 nm de grosor. Empleando esta aproximación, se pueden estimar la magnitud de los diferentes torques y ver su influencia en el movimiento teniendo en cuenta que el torque óptico calculado es del orden de $\sim 10^{-21}$ (ver **Figura 5.18b**).

Inercia:

$$I = \frac{1}{4}MR^2 = \frac{1}{4}x\rho_{NaYF_4}xVxR^2 \sim 10^{-29} Kg m^2 \quad (\text{E.3})$$

Donde se han empleado la densidad de masa de la partícula $\rho_{NaYF_4} = 4.2 g/cm^3$, su volumen $V = 2 \times 10^8 nm^3$, y el radio $R = 400 nm$. El término de inercia puede despreciarse.

Fluctuaciones térmicas:

El torque debido a las fluctuaciones térmicas puede despreciarse ya que únicamente introduce una indeterminación en el ángulo y no influye en la rotación.

Rozamiento:

El coeficiente de rozamiento de una partícula en forma de disco que rota sobre su extremo viene dado por:[1]

$$\beta = 6\eta V \frac{f}{f_0} \quad (\text{E.4})$$

Donde $\frac{f}{f_0} = \frac{4}{3} \frac{1-p^2}{2-p^2 h S}$ es el factor de Perrin con p la relación de aspecto de la partícula y S viene dado por:

$$S = \frac{2}{h} (p^2 - 1)^{-\frac{1}{2}} \tan^{-1} \left((p^2 - 1)^{\frac{1}{2}} \right) \quad (\text{E.5})$$

Introduciendo el valor de los distintos parámetros en el coeficiente de rozamiento se obtiene:

$$\beta \sim \eta 10^{-21} \text{ m}^3 \quad (\text{E.6})$$

La viscosidad de la célula es del orden de Pa s, por lo que, en ese caso, el coeficiente de rozamiento será del orden de $\sim 10^{-21} \text{ Kg m}^2/\text{s}$ y no puede despreciarse su contribución.

Gravedad:

Una vez despreciadas las contribuciones de las fluctuaciones térmicas y la inercia, el torque debido a la gravedad también puede no tenerse en cuenta. Se observó que las partículas dispersas en agua alcanzaban su orientación final en un tiempo menor que la resolución temporal del detector (0.2s). En estas circunstancias, el término del rozamiento también puede despreciarse ya que la viscosidad del agua es reducida ($\eta \sim 10^{-3} \text{ Pa s}$). De esta manera, la acción de la gravedad es la única que puede frenar la acción del torque óptico cuando las partículas están dispersas en agua. De esto se puede concluir que el torque debido a la gravedad es mucho menor que el óptico, ya que no impide que las partículas se orienten rápidamente cuando están dispersas en agua.

Se concluye así que el término de rozamiento es el único que no puede despreciarse, por lo que la rotación de la partícula viene dada por:

$$\beta \dot{\theta} = \tau_{OT} \quad (\text{E.7})$$

Esta ecuación puede resolverse analíticamente, de tal manera que se obtiene el tiempo de transición entre la orientación horizontal y la vertical (Δt_R , el tiempo que tarda la partícula en realizar el giro de $\pi/2$):

$$\Delta t_R = \int_0^{\pi/2} \frac{\beta}{\tau_{OP}(\theta)} d\theta = 6\eta V \frac{f}{f_0} \int_0^{\pi/2} \frac{1}{\Gamma(\theta)} d\theta \quad (\text{E.8})$$

Donde $\Gamma(\theta)$ es el torque calculado empleando la expresión 2.15. El valor de $\Gamma(\theta)$ dependerá de la intensidad de potencia láser aplicada (I_L), de tal manera que su valor debe

ser determinado para cada experimento. Con el fin de facilitar el tratamiento de datos, se calculó el valor de $\Gamma(\theta)$ para cualquier intensidad de potencia dada. Introduciendo la integral de este nuevo torque independiente de la potencia y los valores para el resto de constantes y sustituyendo el tiempo de rotación por la velocidad angular de rotación ($\Delta t_R = 2/\pi\omega_R$) se obtiene que:

$$\eta = \frac{\pi}{2} \frac{6.7 \times 10^{-13}}{\omega_R} I_L \quad (\text{E.9})$$

Esta expresión permite determinar el valor de la viscosidad dinámica a través de la medida de la velocidad angular de rotación, si se conoce la intensidad de potencia láser aplicada.

Anexo E.2. Método pasivo.

A continuación se explica el desarrollo teórico que permite el cálculo de la viscosidad estática a través del desplazamiento angular cuadrático medio (MSAD) de la partícula (expresión 5.9).

Anexo E.2a. Desplazamiento angular cuadrático medio.

El MSAD se define como:

$$MSAD(t_i) = \sum_{t=0}^{t_i} (\theta_i - \bar{\theta})^2 \quad (\text{E.10})$$

Donde θ_i es el ángulo en el tiempo t_i y $\bar{\theta}$ es el ángulo medio. Empleando la expresión E.10 se puede calcular la evolución del MSAD de la partícula a través del ángulo obtenido del cociente de intensidades.

Anexo E.2b. Obtención del ángulo de rotación del cociente de intensidades.

El cociente de intensidades I_{656}/I_{664} permite determinar el ángulo de rotación de la partícula. En los experimentos de microreometría se midió el espectro de emisión no polarizado en función del tiempo, de tal manera que I_{656}/I_{664} caracterizaba la orientación de la partícula a cada instante. Cuando la partícula se encuentra en la orientación horizontal ($\theta = 0$), I_{656}/I_{664} está representado por su valor mínimo ($I_{656}/I_{664}(0) = I_{656}/I_{664}^{min}$) correspondiente al estado de polarización σ . Al situarse la partícula verticalmente ($\theta = \pi/2$), el cociente de intensidades alcanza su valor máximo ($I_{656}/I_{664}(\pi/2) = I_{656}/I_{664}^{max}$) que corresponde a un espectro de emisión resultado de la unión de los estados de polarización π y α . A lo largo de la rotación, el cociente toma valores entre I_{656}/I_{664}^{min} y I_{656}/I_{664}^{max} . En particular, para cualquier ángulo de rotación θ , el espectro de emisión no polarizado vendrá dado por contribuciones de los estados de polarización π y α cuyo peso viene determinado por el seno y coseno del ángulo de rotación. De esta manera, el cociente de intensidades para cualquier ángulo de rotación viene dado por:

$$I_{656}/I_{664}(\theta) = I_{656}/I_{664}^{min} \sin^2 \theta + I_{656}/I_{664}^{max} \cos^2 \theta \quad (\text{E.11})$$

Despejando la expresión anterior se obtiene la relación que permite calcular el ángulo de rotación a través de la medida del cociente de intensidades:

$$\theta(I_{656}/I_{664}) = \arccos \left(\sqrt{\frac{I_{656}/I_{664}^{max} - I_{656}/I_{664}}{I_{656}/I_{664}^{max} - I_{656}/I_{664}^{min}}} \right) \quad (\text{E.12})$$

El valor de I_{656}/I_{664}^{max} e I_{656}/I_{664}^{min} depende tanto de la partícula a estudio como de las condiciones experimentales. Por ello, para minimizar el error experimental a la hora de determinar el ángulo de rotación, es conveniente medir los valores máximo y mínimo del cociente de intensidades para cada partícula a estudio. Cuando esto no es posible, se puede tomar el valor medio calculado del correspondiente a distintas partículas. Se calculó que una variación de un 10% en el valor de I_{656}/I_{664}^{min} introduce un cambio de un 4% en el ajuste del MSAD lo que provoca una indeterminación en la viscosidad de un 4%. Este error es despreciable frente al error estadístico (20%) producido por la alta variabilidad que presentan las células y a los introducidos por el resto de variables del sistema.

Anexo E.2c. Relación entre el MSAD y la viscosidad estática.

La evolución temporal del MSAD de la partícula en el fluido viene determinada por su coeficiente de difusión (D):[2, 3]

$$MSAD(rad^2) = 2 D t^\alpha \quad (\text{E.13})$$

El parámetro α determina si el movimiento de la partícula está restringido ($\alpha < 1$) o si ésta está siendo forzada a moverse (superdifusión, $\alpha > 1$). En este caso, el valor de α se fija a 1 ya que se asume que el desplazamiento angular es sólo debido a las fluctuaciones térmicas.[4, 5]

Como se vio en la sección 2.2b el coeficiente de difusión viene determinado por:

$$D = \frac{k_B T}{6\eta_e V \frac{f}{f_0}} \quad (\text{E.14})$$

Donde se ha sustituido el coeficiente de rozamiento por el correspondiente a un disco que rota sobre uno de sus extremos (expresión E.4). Sustituyendo la expresión E.14 en E.13 se obtiene la relación entre el MSAD y la viscosidad estática del medio:

$$MSAD(rad^2) = 2 \frac{k_B T}{6\eta_e V \frac{f}{f_0}} t \quad (\text{E.15})$$

Anexo F. Incorporación de las partículas en forma de disco por las células.

Para determinar experimentalmente el mecanismo por el que las células incorporan las partículas, se realizaron cultivos a baja temperatura (4 °C) (ver sección 4.4a). El proceso de endocitosis únicamente ocurre a una temperatura en torno a 37 °C, por lo que, si no se detectan partículas en el interior celular después de una incubación a 4 °C, se puede afirmar que las células incorporan las partículas por endocitosis.[6]

Después de la incubación a baja temperatura, las células se colocaron en el sistema experimental descrito en la sección 4.2a. En esta ocasión, la fuente de excitación (de 980 nm) se colocó debajo de la muestra y se empleó un objetivo de baja apertura numérica (10X, 0.25 AN) para focalizar la radiación. De esta manera, una región del alrededor de $10^3 \mu\text{m}^2$ (extensión mayor que una célula) fue iluminada. Se empleó una intensidad de potencia del orden de $2 \times 10^8 \text{ W/m}^2$. En la **Figura A.4** se muestra el resumen del experimento. En las partículas incubadas a baja temperatura no se detectaron partículas en su interior. Cuando células incubadas a 37 °C eran iluminadas con el haz de excitación, la luminiscencia de las partículas interiorizadas era detectada.

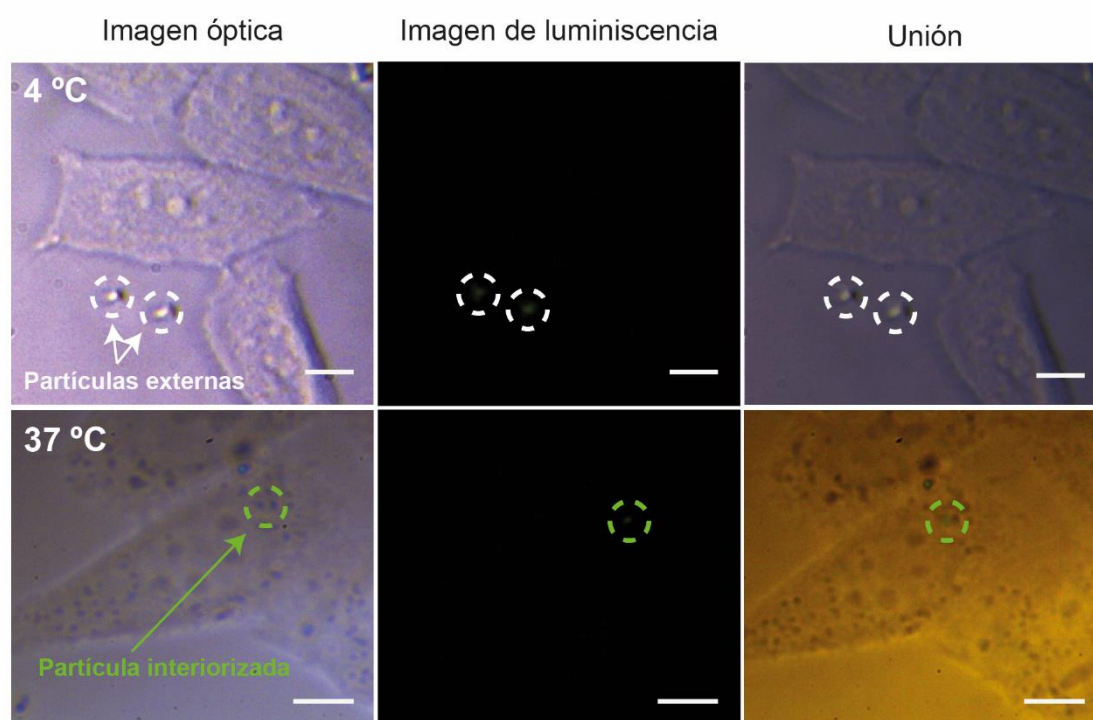


Figura A.4 Cultivos a baja temperatura. Se muestran las imágenes ópticas y de luminiscencia obtenidas para células incubadas en dos condiciones de temperatura: 4 °C (arriba) y 37 °C (abajo). En todas las imágenes la escala indica 20 μm . Únicamente se detecta luminiscencia en el interior de partículas incubadas a 37 °C.

Los resultados obtenidos evidencian que las partículas son incorporadas por endocitosis. Este resultado es el esperado ya que las partículas tienen un tamaño mayor que el asociado a la incorporación pasiva.[7]

Anexo G. Viscosidades intracelulares publicadas en la literatura.

En la **Tabla A.1** se recogen los valores publicados para la viscosidad intracelular de células HeLa y fibroblastos recogidos en la literatura. También se incluyen los datos medidos en esta tesis. Se han indicado la partícula empleada, la manera de introducirla en la célula y el tipo de método empleado. Los experimentos realizados durante esta tesis se han centrado en células HeLa. Sin embargo, aquí también se presentan datos publicados para fibroblastos con el fin de obtener una discusión más completa.

Existe una gran dispersión en los datos publicados debido a diferentes razones:

En primer lugar, las células presentan una alta variabilidad debido a la multitud de parámetros que influyen en su estado. Por esta razón, los valores medidos dependerán de las condiciones experimentales. Además, diferentes líneas celulares presentan distintos valores de viscosidad.

Por otro lado, como está explicado en el capítulo 5, la viscosidad medida depende del tamaño de la partícula empleada para medirla. Por ejemplo, una molécula experimentará la viscosidad intersticial debida a los elementos que se encuentran entre las fibras que forman el citoesqueleto, mientras que la viscosidad que actúe sobre partículas del orden de micras será debida principalmente a dichas fibras. Por esta razón, la viscosidad medida con moléculas es del orden de la del agua, mientras que la medida por partículas mayores es mayor.

También hay que hacer una distinción entre los datos medidos empleando un método activo o pasivo. Como se explica en el texto principal, cada método permite estudiar distintos fenómenos, por lo que la viscosidad estimada dependerá de cómo se mida.

Por último, hay que indicar que el recubrimiento de la partícula y cómo ha sido introducida en la célula pueden influir en el resultado obtenido.

| Ref. | Muestra | Incorporación | Método | Viscosidad (Pa s) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------|--------------------|
| HeLa | | | | |
| Esta tesis | Discos 800 nm de diámetro | Endocitosis | Pasivo | 1.65-2.90 |
| Esta tesis | Discos 800 nm de diámetro | Endocitosis | Activo | 1.80-0.070 |
| [8] | De distinto tamaño y forma | --- | Pasivo | 0.044 ^A |
| [9] | Nanodiamantes 40 nm de diámetro | Interiorizada | Pasivo | 3.78 ^B |
| [9] | Nanodiamantes rodeados de lípidos 160 nm de diámetro | Interiorizada | Pasivo | 0.001 ^B |
| [10] | Cilíndricas 2-6 µm de largo | Sin membrana plasmática a su alrededor | Activo | --- ^C |
| [11] | Molécula | Interiorizado | Pasivo | --- ^D |
| [12] | Nanocilindros de carbono de pared simple 0.5-1.2 µm de largo | Endocitosis | Pasivo | 0.054-0.179 |
| [13] | Esfera 100 nm de diámetro | Inyectada | Pasivo | --- |
| [14] | Molécula | Inyectada | Pasivo | 0.060-0.175 |
| NIH/3T3 fibroblasto | | | | |
| [10] | Cilíndrica 1.9 µm de largo | Sin membrana plasmática alrededor | Activo | 32 |
| [10] | Cilíndrica 2.8 µm de largo | Sin membrana plasmática alrededor | Activo | 26 |
| [10] | Cilíndrica 3.0 µm de largo | Sin membrana plasmática alrededor | Activo | 59 |
| [10] | Cilíndrica 5.9 µm de largo | Sin membrana plasmática alrededor | Activo | 78 |
| [8] | De distinto tamaño y forma | --- | Pasivo | 0.024 ^A |
| [2] | Cilíndrica 1-10 µm de largo | Sin membrana plasmática a su alrededor | Pasivo | 0.160 |
| [15] | Esfera 100 nm de diámetro | Inyectada | Pasivo | 0.4-220 |
| [16] | Molécula | Incorporación pasiva | Pasivo | 0.0012 |
| [16] | Molécula | Endocitosis | Pasivo | 0.0014 |

--- No dan valor de la viscosidad.

^A Valor estimado para la viscosidad macroscópica.

^B Valor calculado del coeficiente de difusión (D). ($\eta = K_B T / 6\pi r_H D$) [17]

^C Resultado no concluyente debido a la gran variabilidad que presentan los parámetros reológicos.

^D Muestran la heterogeneidad de la viscosidad intracelular.

Tabla A.1 Viscosidad intracelular. Resultados publicados en la literatura para la viscosidad del citoplasma de células HeLa y fibroblastos.

Referencias.

1. R. M. Erb, et al., *Non-linear alignment dynamics in suspensions of platelets under rotating magnetic fields*. Soft Matter, 2012. **8**(29): p. 7604.
2. L. Chevry, et al., *Intracellular micro-rheology probed by micron-sized wires*. Biomaterials, 2013. **34**(27): p. 6299.
3. M. A. Islam, *Einstein–Smoluchowski Diffusion Equation: A Discussion*. Physica Scripta, 2004. **70**(2-3): p. 120.
4. C. Ying-chun and W. Chien-ming, *To Study the Effect of Paclitaxel on the Cytoplasmic Viscosity of Murine Macrophage Immune Cell RAW 264.7 Using Self-Developed Optical Tweezers System*. Japanese Journal of Applied Physics, 2012. **51**(12R): p. 127001.
5. J. S. H. Lee, et al., *Ballistic intracellular nanorheology reveals ROCK-hard cytoplasmic stiffening response to fluid flow*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(9): p. 1760.
6. P. K. Peterson, et al., *Influence of temperature on opsonization and phagocytosis of staphylococci*. Infection and Immunity, 1977. **15**(1): p. 175.
7. L. Shang, et al., *Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters*. Journal of Nanobiotechnology, 2014. **12**(1): p. 5.
8. T. Kalwarczyk, et al., *Comparative Analysis of Viscosity of Complex Liquids and Cytoplasm of Mammalian Cells at the Nanoscale*. Nano Letters, 2011. **11**(5): p. 2157.
9. Y. Y. Hui, et al., *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy of lipid-encapsulated fluorescent nanodiamonds in living cells*. Optics Express, 2010. **18**(6): p. 5896.
10. J. F. Berret, *Local viscoelasticity of living cells measured by rotational magnetic spectroscopy*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 10134.
11. S. Chen, et al., *Mapping Live Cell Viscosity with an Aggregation-Induced Emission Fluorogen by Means of Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging*. Chemistry – A European Journal, 2015. **21**(11): p. 4315.
12. N. F. Reuel, et al., *Three-Dimensional Tracking of Carbon Nanotubes within Living Cells*. ACS Nano, 2012. **6**(6): p. 5420.
13. Y.-Q. Chen, et al., *Intracellular viscoelasticity of HeLa cells during cell division studied by video particle-tracking microrheology*. Journal of Biomedical Optics, 2013. **19**(1): p. 011008.
14. T. Liu, et al., *Quantitatively Mapping Cellular Viscosity with Detailed Organelle Information via a Designed PET Fluorescent Probe*. Scientific Reports, 2014. **4**: p. 5418.
15. Y. Tseng, et al., *Micro-organization and visco-elasticity of the interphase nucleus revealed by particle nanotracking*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(10): p. 2159.
16. K. Fushimi and A. S. Verkman, *Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry*. Journal of Cell Biology, 1991. **112**(4): p. 719.
17. J. Brillo, et al., *Relation between Self-Diffusion and Viscosity in Dense Liquids: New Experimental Results from Electrostatic Levitation*. Physical Review Letters, 2011. **107**(16): p. 165902.

TABLA DE SÍMBOLOS Y CONSTANTES.

| Símbolo | Descripción |
|------------------|----------------------------------------------------------------------|
| α_{abs} | Coeficiente de absorción |
| α_{NP} | Polarizabilidad de la nanopartícula |
| α_I | Parte imaginaria de la polarizabilidad de la nanopartícula |
| α_R | Parte real de la polarizabilidad de la nanopartícula |
| α_0 | Polarizabilidad de una nanopartícula muy pequeña |
| a | Aceleración |
| A | Probabilidad de transición dipolar eléctrica |
| A_i | Probabilidad de emisión desde el nivel i al fundamental |
| A_{nr} | Probabilidad de emisión no radiativa |
| AN | Apertura numérica |
| AN_{ef} | Apertura numérica efectiva |
| β | Coeficientes de rozamiento |
| B | Campo magnético |
| c | Velocidad de la luz en el vacío |
| C | Cociente de intensidades |
| C_{abs} | Sección eficaz de absorción |
| C_{ext} | Sección eficaz de extinción |
| C_{scat} | Sección eficaz de <i>scattering</i> |
| cte | Constante |
| δ_{ij} | Delta de Kronecker |
| ΔE | Separación en energía entre dos niveles |
| $\Delta T(r)$ | Incremento de temperatura en función de la distancia r a la fuente |
| $\Delta T(0)$ | Incremento máximo de temperatura |
| Δt_R | Tiempo de rotación |
| d | Distancia (referido en casa caso) |
| D | Coeficiente de difusión |
| d_λ | Longitud de Debye |
| d_{crit} | Distancia crítica |
| Dim | Dimensión característica del medio que está siendo calentado |
| DO | Densidad óptica |
| e | Carga elemental |
| η | Viscosidad |
| η_d | Viscosidad dinámica |
| η_e | Viscosidad estática |
| ϵ_0 | Permitividad del vacío |
| ϵ_m | Permitividad del medio |
| ϵ_{NP} | Permitividad de la nanopartícula |
| ϵ_c | Permitividad del recubrimiento de la nanopartícula |
| ϵ_{nuc} | Permitividad del núcleo de la nanopartícula |
| e | Carga del electrón |
| E | Campo eléctrico |
| E_{TRAP} | Campo eléctrico de la luz de atrapamiento |
| ϕ | Apertura trasera del objetivo |
| f | Frecuencia de vibración |
| f_c | Frecuencia de corte |

| | |
|--------------|------------------------------------------------------------------|
| f_{exp} | Ancho de banda del detector |
| F_d | Fuerza de rozamiento o arrastre producida por un fluido |
| F_{grad} | Fuerza óptica de gradiente |
| F_{OT} | Fuerza óptica |
| F_{scat} | Fuerza óptica de <i>scattering</i> |
| $F_{th}(t)$ | Fuerza inducida por las fluctuaciones térmicas |
| γ | Grado de polarización |
| g | Aceleración de la gravedad |
| $g(\omega)$ | Forma de línea |
| GNR | <i>Gold nanorod</i> |
| h | Constante de Plank |
| \hbar | Constante de Plank reducida |
| I | Intensidad |
| I_{em} | Intensidad emitida |
| I_0 | Intensidad incidente |
| I_{max} | Intensidad máxima |
| I_{min} | Intensidad mínima |
| IP | Polarización inducida |
| j | Corriente de desplazamiento asociada al campo eléctrico |
| K | Constante de atrapamiento |
| k | $2\pi n_m/\lambda_0$ |
| k_B | Constante de Boltzmann |
| k_g | Fracción de fotones emitidos que llegan al detector |
| λ | Longitud de onda en un medio |
| λ_0 | Longitud de onda en el vacío |
| l | Número cuántico acimutal |
| m | Número cuántico magnético |
| M | Masa de la partícula |
| μ_0 | Permeabilidad magnética del vacío |
| $ \mu_{if} $ | Módulo del elemento de matriz del momento dipolar eléctrico |
| MAO | Momento angular orbital |
| MAS | Momento angular de spin |
| n | Número cuántico principal |
| N_i | Población electrónica del nivel i |
| n_m | Índice de refracción del medio |
| n_p | Índice de refracción de la partícula |
| $n(r)$ | Vector unitario normal a la superficie |
| ν | Frecuencia de la radiación |
| ψ | Autofunción del Hamiltoniano |
| p | Relación de aspecto |
| P | Potencia láser |
| P_{if} | Probabilidad de absorción |
| PBS | Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| $Prob(x_i)$ | Densidad de probabilidad en la dirección espacial x_i |
| $Pot(f)$ | Espectro de potencias |
| PSD | <i>Power spectral density</i> |
| Q | Momento lineal transferido a la partícula |
| Q_r | Momento lineal transferido a la partícula en la dirección radial |
| QE | Eficiencia cántica (<i>quantum efficiency</i>) |

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------|
| Q_L | Eficiencia de luminiscencia |
| QPD | Fotodiodo de cuadrantes (<i>Quadrant photodiode</i>) |
| ρ | Densidad de masa |
| R | Radio de la partícula |
| r | Distancia respecto el centro de la trampa |
| r_{eq} | Posición de equilibrio respecto el centro de la trampa |
| r_{ext} | Extensión del gradiente térmico |
| $ \sigma $ | carga superficial neta de la partícula |
| S | Vector de Pointing |
| S_r | Sensibilidad relativa |
| SPR | <i>Surface plasmon resonance</i> |
| T | Temperatura |
| $T(r, t), T_{ij}$ | Tensor de Maxwell |
| t_{total} | Tiempo de medida total |
| Γ | Torque óptico |
| u_e | Momento dipolar eléctrico |
| u_m | Momento dipolar magnético |
| v | Velocidad relativa entre la partícula y el fluido |
| V | Volumen de la partícula |
| V_{NP} | Volumen de la nanopartícula |
| V_{nuc} | Volumen del núcleo de la nanopartícula |
| w_0 | Radio de la trampa (<i>beam waist</i>) |
| ω | Frecuencia de la luz |
| ω_R | Velocidad angular de rotación |
| ϕ | Apertura trasera del microscopio |
| X | Desviación del haz al ser dispersado por la partícula |
| χ | Susceptibilidad |
| x_i | Posición en las direcciones del espacio x, y o z |
| \tilde{x}_{ik} | Transformada de Fourier de x_i |
| ζ | Potencial zeta |